

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## چکیده:

**زمینه:** گیرنده عامل رشد فیبروبلاستی 2b (FGFR2b) در مسیر پیام رسانی سلولی و تنظیم فرایندهای مهم زیستی از جمله تکثیر و تمایز سلولی نقش اساسی دارد. به علاوه تغییرات ژنتیکی نظیر جهش نقطه‌ای در ناحیه تیروزین کینازی FGFR2b با سرطان پستان، تخمدان و رحم در ارتباط است. هم‌چنین مطالعه‌های اپیدمیولوژیکی و مدل‌های حیوانی و سلولی نشان داده‌اند که فلاونوئیدها؛ روی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی تأثیر دارند. نارنجین یک ترکیب فعال بیولوژیکی سیتوتوکسیک در برابر سلول‌های سرطانی خاص است بدون اینکه آسیبی به سلول‌های طبیعی وارد کند و به طور قابل توجهی تنظیم فسفوریلاسیون مسیرهای انتقال سیگنال را کاهش می‌یابد. هم‌چنین در تکثیر سلولی نقش دارد.

**هدف:** این مطالعه به منظور بیان و خالص‌سازی مقدار مناسبی از ناحیه کینازی FGFR2b انسانی و بررسی تغییرات ساختاری آن در برهمکنش با فلاونوئید از جمله نارنجین انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از IPTG القا و تخلیص آن به وسیله ستون انجام گرفت. طیف فلورسانس و دنا‌توراسیون شیمیایی در حضور غلظت‌های مختلف نارنجین سنجیده شد.

**یافته‌ها:** بیان و تخلیص پروتئین و بررسی طیف سنجی فلورسانس افزایش شدت نشر را با افزایش تدریجی غلظت نارنجین و ناپایداری این پروتئین را نشان داد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** باتوجه به یافته‌ها، نشان داده شد ناحیه کینازی گیرنده نوترکیب عامل رشد فیبروبلاستی 2b خالص شده که یک پروتئین 38 کیلودالتونی است به صورت محلول و فعال می‌باشد. تغییرات ساختار سوم دومین کینازی موجب ناپایدار شدن آن در حضور نارنجین گردید. این ناپایداری در سطح مولکولی می‌تواند موجب اختلال در مسیر پیام رسانی سلول شود. این مطالعه هم جهت با مطالعات قبلی، استفاده از فلاونوئیدها را در درمان سرطان به عنوان یک درمان جانبی پیشنهاد می‌کند.

**کلیدواژه‌ها:** عامل رشد فیبروبلاست، خالص‌سازی پروتئین، ناحیه کینازی، نارنجین، طیف سنج فلورسانس

## فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۱- فصل اول: مقدمه	۱
۱-۱- بیان مسئله	۲
۱-۱-۱- سرطان و درمانهای مرتبط با آن	۲
۱-۱-۲- فلاونوئیدها و سرطان و کاربرد آن در طراحی داروهای ضدسرطان	۳
۱-۱-۳- گیرنده های تیروزین کینازی به عنوان یک هدف درمانی در سرطان	۷
۱-۱-۴- فعالسازی کینازها از طریق ایجاد موتاسیون و راهکارهای درمانی سرطان از طریق مهار کینازها	۹
۲- ضرورت انجام تحقیق	۱۰
۳-۱- اهداف و فرضیات تحقیق	۱۱
۳-۱-۱- هدف اصلی	۱۱
۳-۱-۲- اهداف فرعی	۱۱
۳-۱-۳- اهداف کاربردی	۱۱
۳-۱-۴- فرضیات تحقیق	۱۲
۴-۱- تعریف متغیرها	۱۲
۵-۱- تعریف اصطلاحات	۱۳
۲- فصل دوم: پیشینه تحقیق	۲
۲-۱- مروری بر مطالعات انجام شده	۱۶
۲-۱-۱- ارتباط ساختار و عملکرد پروتئینها	۱۶
۲-۱-۲- گیرندههای تیروزین کینازی	۱۷
۲-۱-۳- فاکتورهای رشد فیبروبلاستی	۱۸
۲-۱-۴- گیرندههای فاکتور رشد فیبروبلاستی	۲۰
۲-۱-۵- گیرندههای فاکتورهای رشد فیبروبلاستی و اختلالات پاتولوژیکی	۲۲
۲-۲- مسیر پیامرسانی سلولی فاکتورهای رشد فیبروبلاستی	۲۶
۲-۲-۱- مسیر Ras/MAP Kinase	۲۶
۲-۲-۲- مسیر PLCy/ca <sup>2+</sup>	۲۷
۲-۲-۳- مسیر PL <sub>3</sub> Kinase/ Akt	۲۷
۲-۲-۴- تنظیم مسیر پیامرسانی فاکتورهای رشد فیبروبلاستی	۲۹
۳-۲- ساختار عملکرد نارنجین	۳۰

۳۱	فلاونوئید و سرطان	۱-۳-۲
۳۲	مکانیسم مولکولی نارنجین در سرطان	۲-۳-۲
۳۳	مطالعه‌ی ساختاری پروتئینها	۴-۲
۳۵	تکنیکهای مطالعه ساختار پروتئینها	۵-۲
۳۵	تاخوردگی (Folding) پروتئین	۱-۵-۲
۳۵	مطالعه تاخوردگی (Folding) مولتی دومن پروتئینها	۲-۵-۲
۳۶	کنیک فلورسانس اسپکتروسکوپی	۶-۲
۳۷	مرحله آسایش ارتعاشی (Vibrational Relaxation)	۱-۶-۲
۳۷	مرحله تبدیل درونی (Internal Conversion)	۲-۶-۲
۳۸	مرحله فلورسانس	۳-۶-۲
۳۸	مرحله تبدیل بیرونی (External Conversion)	۴-۶-۲
۳۸	مرحله عبور سیستمی (Intersystem Crossing)	۵-۶-۲
۳۹	مرحله فسفرسانس	۶-۶-۲
۴۰	تکنیکها و عوامل دنا تورا سیون	۷-۲
۴۰	دنا تورا سیون	۱-۷-۲
۴۱	مطالعه پایداری پروتئینها	۲-۷-۲
۴۱	روش دنا تورا سیون شیمیایی	۳-۷-۲
۴۲	تکنیکهای تولید و تلخیص پروتئینهای نو ترکیب	۸-۲
۴۲	کاربرد پروتئینهای نو ترکیب	۱-۸-۲
۴۳	پروتئینهای نو ترکیب (Recombinant Protein)	۲-۸-۲
۴۵	تولید پروتئین های نو ترکیب در گیاهان	۹-۲
۴۶	استفاده از E. coli به عنوان یک ارگانیسم میزبان برای تولید پروتئین	۱-۹-۲
۴۶	خالص سازی پروتئین های نو ترکیب	۲-۹-۲
۱۶	فصل سوم: مواد و روش ها	۳
۴۷	۱-۳- مواد، تجهیزات و متغیرهای آزمایشی	۳
۴۷	۱-۱-۳- مواد مورد استفاده در آزمایش	۳
۴۸	۲-۱-۳- دستگاهها و تجهیزات مورد استفاده در آزمایش	۳
۴۹	۲-۲- محلول ها و بافرها	۳
۴۹	۱-۲-۳- تهیه استوک آمپی سیلین	۳
۵۰	۲-۲-۳- تهیه استوک IPTG	۳
۵۰	۳-۲-۳- تهیه بافر لیزکننده سلول جهت بررسی حلالیت پروتئین	۳
۵۰	۴-۲-۳- تهیه بافر لیزکننده سلول جهت تلخیص پروتئین	۳
۵۰	۵-۲-۳- تهیه محلول ژل پلی آکریل آمید ۴٪	۳

۵۰	تهیه محلول ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪	۶-۲-۳
۵۱	تهیه محلول APS ۱۰٪	۷-۲-۳
۵۱	تهیه بافر الکتروود ۱۰ X (Running buffer)	۸-۲-۳
۵۱	تهیه بافر نمونه (Sample Buffer)	۹-۲-۳
۵۱	تهیه محلول Tris- Hcl ۰/۵ مولار	۱۰-۲-۳
۵۱	تهیه محلول Tris- Hcl ۱/۵ مولار	۱۱-۲-۳
۵۲	تهیه Staining Buffer	۱۲-۲-۳
۵۲	تهیه Destaining Buffer	۱۳-۲-۳
۵۲	تهیه محلول آکریل آمید- بیس آکریل آمید	۱۴-۲-۳
۵۲	تهیه بافر SDS	۱۵-۲-۳
۵۲	تهیه بافر A (Washing Buffer)	۱۶-۲-۳
۵۲	تهیه بافر B (Eluting Buffer)	۱۷-۲-۳
۵۳	تهیه بافر دیالیز	۱۸-۲-۳
۵۳	تهیه استوک گوانیدین هیدروکلراید (GdnHCl)	۱۹-۲-۳
۵۳	تهیه نارنجین	۳-۳-۳
۵۳	آماده سازی محیطهای کشت باکتری	۱-۳-۳
۵۳	محیط کشت LB Broth	۲-۳-۳
۵۴	محیط کشت LB Agar	۳-۳-۳
۵۴	روش انجام کار	۴-۳-۳
۵۵	مراحل تولید پروتئین نوترکیب	۵-۳-۳
۵۵	تهیه سلولهای پذیرا (competent cells)	۱-۵-۳
۵۶	روش آماده سازی سلولهای پذیرا	۲-۵-۳
۵۷	ترانسفورماسیون سلولهای پذیرا	۳-۵-۳
۵۷	بررسی بیان پروتئین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد	۴-۵-۳
۵۹	ارزیابی حلالیت پروتئین بیان شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد	۵-۵-۳
۵۹	روش انجام SDS-PAGE به منظور بررسی بیان پروتئین	۶-۳-۳
۵۹	ارزیابی حلالیت پروتئین بیان شده در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد	۱-۶-۳
۶۰	تخلیص پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی	۲-۶-۳
۶۰	تعیین غلظت پروتئین	۳-۶-۳
۶۱	مطالعات اسپکتروسکوپی فلوئورسنس	۷-۳-۳
۶۲	مطالعات دناتوراسیون شیمیایی با استفاده از اسپکتروسکوپی فلوئورسنس	۱-۷-۳
۴۷	فصل چهارم: یافته ها و نتایج	
۶۴	۱- بررسی بیان پروتئین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد	

۶۵	۴-۲- بررسی بیان پروتئین در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد
۶۶	۴-۳- بررسی حلالیت پروتئین بیان شده در دو دمای ۲۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد
۶۷	۴-۴- بررسی میزان خلوص پروتئین محلول شده
۶۸	۴-۵- آنالیز SDS-PAGE بعد از دیالیز
۶۹	۴-۶- بررسی عملکرد پروتئین خالص شده
۷۰	۴-۷- بررسی ساختار سوم ناحیه ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b
۷۰	۴-۸- بررسی فلوئورسنس ذاتی فولدینگ ناحیه ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b
	۴-۹- بررسی اثر دناتوراسیون شیمیایی بر طول موج ماکزیمم نشر فلوئورسنس ذاتی ناحیه ی تیروزین کینازی
۷۱	پروتئین نوترکیب FGFR2b
۷۱	۴-۹-۱- ناحیه ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b
۶۴	۵- فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری
۷۵	۵-۱- بحث و نتیجه گیری
۸۰	منابع
۸۹	چکیده انگلیسی

## فهرست اشکال

- شکل ۱-۲- دسته بندی گیرنده های تیروزین کینازی..... ۱۷
- شکل ۲-۲- ساختار فاکتورهای رشد فیبروبلاست..... ۱۹
- شکل ۳-۲- ساختار کریستالی کمپلکس FGFR2b-FGF10..... ۲۰
- شکل ۴-۲- گیرنده های فاکتور رشد فیبروبلاستی و نواحی فسفریله شدن آن..... ۲۲
- شکل ۵-۲- موتاسیون ها نقطه ای پاتولوژیک گیرنده ی فاکتور رشد فیبروبلاستی..... ۲۵
- شکل ۶-۲- مسیر پیام رسانی گیرنده های فاکتورهای رشد فیبروبلاستی..... ۲۸
- شکل ۷-۲- ساختار شیمیایی اسیدآمینوهای تیروزین (Y)، تریپتوفان (W) و فنیل آلانین (F)..... ۳۴
- شکل ۸-۲- دیاگرام جابلونسکی..... ۴۰
- شکل ۹-۲- ساختار شیمیایی اوره و گوانیدین هیدروکلراید..... ۴۲
- شکل ۱-۳- نمایش ساختار پلاسمید نوترکیب pLEICS-01 و توالی ژنی ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b..... ۵۴
- شکل ۲-۳- توالی ژنی ناحیه کینازی و نقشه شماتیک از پلاسمید pLEICS-01..... ۵۵
- شکل ۱-۴- بیان ژن ناحیه ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در باکتری E.coli در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد..... ۶۴
- شکل ۲-۴- بیان ژن ناحیه ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در باکتری E.coli در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد..... ۶۵
- شکل ۳-۴- مقایسه ی حلالیت ناحیه ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در دو دمای ۲۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد..... ۶۶
- شکل ۴-۴- خالص سازی ناحیه ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی Ni2+-NTA..... ۶۷
- شکل ۵-۴- نتایج SDS-PAGE بعد از دیالیز..... ۶۸
- شکل ۶-۴- بررسی عملکرد ناحیه ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b خالص شده..... ۶۹
- شکل ۷-۴- نمونه بعد از القاء با IPTG..... ۷۲
- شکل ۸-۴- الگوی الکتروفورز..... ۷۳
- شکل ۹-۴- وضعیت ساختار سوم ناحیه ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b..... ۷۳

## فهرست جداول

- جدول ۱-۱- جدول متغیرها ..... ۱۲
- جدول ۱-۲- خصوصیات فلورسانس اسیدآمینه<sup>۶</sup>های آروماتیک ..... ۳۴

## فهرست نمودارها

- نمودار ۱-۴-<sup>۶۶</sup> نمودارهای مربوط به آنالیز فلوئورسنس ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b ..... ۷۱



## فصل اول: مقدمه

## ۱-۱- بیان مسئله

### ۱-۱-۱- سرطان و درمان‌های مرتبط با آن

سرطان به عنوان دومین عامل مرگ و میر در جهان بعد از سکته قلبی شناخته شده است (۷۶) در سرطان سلول‌ها به طور غیر عادی تقسیم و تکثیر شده و با نفوذ به بافت‌های سالم یک وضعیت پاتولوژیک در بدن ایجاد می‌کند. در طی رشد و توسعه سرطان، سلول‌های توموری شش قابلیت بیولوژیکی کسب می‌کنند که تحت عنوان نشانه‌های سرطان شناخته می‌شوند. یکی از این نشانه‌ها قابلیت حفظ سیگنال تکثیری می‌باشد که این امر موجب تکثیر مداوم سلول‌های سرطانی می‌شود. دومین نشانه این است که سلول‌های سرطانی شده از سیگنال‌های سرکوب کننده رشد سلولی فرار می‌کنند. سومین نشانه، مقاومت در برابر مرگ سلولی است که ویژگی نامیرایی را در سلول سرطانی ایجاد می‌کند. نشانه‌های دیگر به ترتیب شامل القای رگزایی، تهاجم و متاستاز می‌باشند (۳۷).

امروزه با وجود پیشرفت‌های گسترده در درمان سرطان، بیماران مبتلا به تومورهای پیشرفته هنوز هم در اثر بیماری جان خود را از دست می‌دهند. از این رو داروهای موثرتری در درمان سرطان مورد نیاز است. در سال‌های اخیر، دانش بهتری از آسیب شناسی مولکولی سرطان بدست آمده است که سنتز شمار زیادی از داروهای ضدسرطان جدید را امکان‌پذیر کرده است. در حقیقت هر چند ماه یکبار داروهای جدیدتری به عنوان داروی ضدسرطان مطرح می‌شوند. انجام تحقیقات بیشتر در جهت کشف مسیرهای متابولیکی که به طور ترجیحی در تومورزایی بعضی سرطان‌ها نقش ایفا می‌کنند، در آینده راه را برای محققین در جهت کشف داروهای مهارکننده و یا فعال‌کننده مسیرهای متابولیکی سرطان، هموار می‌سازد. بر خلاف داروهای شیمی درمانی، اغلب این داروهای تازه کشف شده را نمی‌توان در یک گروه خاص دسته‌بندی کرد. طبقه‌بندی داروهای ضد سرطان، از این نظر مورد اهمیت است که به محققین کمک می‌کند تا به یک دیدگاه جامع از داروهای ضدسرطان موجود و نیز درمان سرطان با ترکیبی از این داروها دست یابند.

به طور کلی درمان سرطان شامل استفاده از روش‌های شیمی‌درمانی، هورمون‌درمانی و ایمنی‌درمانی می‌باشد. ترکیباتی نظیر مهارکننده‌های ایزومرازها، مهارکننده‌های میتوز، آنتی‌متابولیت‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل آلکिलه از نظر ساختار شیمیایی و سازوکار عملکردشان در گروه داروهای شیمی‌درمانی جای می‌گیرند. آنتی‌استروژن‌ها و آنتی‌آندروژن‌ها و استروئیدها به عنوان هورمون‌درمانی در درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند و داروهایی نظیر اینترفرون، اینترلوکین-2 و واکسن‌ها تحت عنوان ایمنی‌درمانی در بیماری سرطان کاربرد دارند. علاوه بر این، مولکول هدف این داروهای ضد سرطانی ممکن است در یکی از سطوح DNA, RNA و یا پروتئین باشد. به طور کلی عوامل شیمی‌درمانی در سطح DNA سلول‌های توموری عمل می‌کنند. آنتی‌سنس الیگونوکلوئوتیدها در سطح mRNA و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و مولکول‌های کوچک با پروتئین‌های سلول توموری برهمکنش نشان می‌دهند (۲۹)

#### ۱-۲- فلاونوئیدها و سرطان و کاربرد آن در طراحی داروهای ضدسرطان

فلاونوئید بخشی از طبقه بزرگ مواد شیمیایی ساخته شده توسط نور به نام پلی فنول‌ها می‌باشد. چندین هزار نوع فلاونوئید در مواد غذایی رایج با منشأ گیاهی مثل چای، شکلات، کاکائو، دانه‌ی سویا و شراب وجود دارد. فلاونوئیدها به علت خاصیت جذب حشرات، در گرده افشانی و باروری گیاهان نیز موثر می‌باشند و باعث افزایش مقاومت به عوامل بیماری‌زا در گیاهان می‌شوند (۲۸). مصرف مواد غذایی غنی از ترکیبات پلی فنولی از جمله فلاونوئیدها تاثیر بسزایی در حفظ کارایی مغز، بهبود حافظه و افزایش توانایی یادگیری انسان دارد، از طرفی با بهبود سیگنال‌دهی عصبی در شکل‌گیری حافظه نیز نقش دارد. فلاونوئیدها دارای اثرات قوی آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی هستند. از طرفی سبب فعال شدن آنزیم‌های کلیدی در تنفس میتوکندری شده و از آسیب بافتی جلوگیری می‌کند. (۸۴و۶۱)

تحقیقات انجام گرفته بر روی مدل‌های حیوانی و سلولی و همچنین نتایج بدست‌آمده از مطالعات اپیدمیولوژیکی گویای این مطلب است که فلاونوئیدها قادرند رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی را در

انواع مختلفی از سرطان‌ها مانند سرطان پستان (۲۸)، کولون (۲۳ و ۸۵) و پروستات و پوست تغییر دهند. فلاونوئیدها می‌توانند بوسیله مبارزه با التهاب، اکسیداسیون، مرگ سلولی و رشد سلول‌های توموری در کاهش خطر سرطان موثر باشند. ممکن است فلاونوئیدها در کاهش خطر ابتلا به سرطان تأثیری نداشته باشند اما در کاهش شدت بیماری حتما نقش دارند.

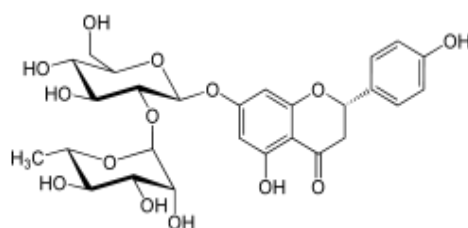
فلاونوئیدها از طریق مهار عناصر کاتالیز شونده از اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند. همچنین در کشور چین برای درمان هیپاتیت از فلاونوئیدها استفاده می‌شود. ۴۵ درصد فلاونوئیدهای مرکبات بطور ویژه جذب ویتامین C را بهبود می‌بخشند. افراد سیگاری و آنهایی که تحت فشار استرس هستند، به میزان زیادی نیاز به ویتامین C و فلاونوئیدهای مرکبات دارند. فلاونوئیدهای مرکبات می‌توانند به فرم ترکیباتی جهت کنترل افراد سیگاری یا به شکل آمپول‌هایی برای ورزشکاران استفاده شوند. کاربرد فلاونوئیدها همراه با داروهای ضدسرطان باعث نفوذ سلولی بهتر دارو، کنترل خواص دارو، فارماکوکینتیک بهتر و همچنین افزایش تجمع دارو در سلول‌های توموری می‌شود. این امر موجب افزایش فعالیت درمانی داروی ضدسرطان و کاهش سمیت آن می‌شود. علاوه بر این، یکی از عمده‌ترین نگرانی‌های بالینی در مسیر درمان سرطان، مقاومت دارویی است. بنابراین یک نیاز واقعی برای طراحی هرچه بهتر داروها برای غلبه بر این نگرانی وجود دارد. در این بین، داروهای ضد سرطانی که پایه‌ی فلاونوئیدی دارند عامل مهمی در غلبه بر مقاومت دارویی هستند (۶۳ و ۷۱).

نارنجین (naringin) گلیکوزید فلاون می‌باشد فلاونوئید اصلی در گریپ فروت است و طعم تلخی به گریپ فروت می‌دهد و به طور طبیعی در مرکبات یافت می‌شود. نارنجین بازدارنده بعضی از داروهای آنزیم سیتوکروم p450 می‌باشد واز متابولیسم این دارو جلوگیری می‌کند که شامل CYP3A4, CYP1A2 می‌باشد که این ممکن است نتیجه برهمکنش میان دارو\_دارو باشد. خوردن نارنجین و یا فلاونوئیدهای مثل نارنجین می‌تواند باعث جذب روده ای برخی داروها شود که در *In Vitro* یا بررسی بر روی حیوانات مشاهده شده اما در سلامتی انسان هنوز ناشناخته است این اثرها شامل:

بازدارنده VEGF که سبب آنژیوژنز می شود. دیابت را کاهش داده و سبب نئوروپاتی در موش می شود و در ادراک اثر محافظتی و آسیب اکسیداتیو در موش نشان داده شده است.

نارنجین یکی از فلاونوئیدهایی است که مزه بسیار تلخی دارد . اثرات نارنجین در درمان سرطان سینه طی آزمایشات بالینی به اثبات رسیده است(45). در کشاورزی از نارنجین بعنوان محرک رشد برخی از سبزیجات مانند کلم چینی و تربچه استفاده میشود(38) . طی بررسیهای بعمل آمده میزان فلاونوئیدهای موجود در مرکبات به شدت بستگی به زمان برداشت میوه های آن دارد (55). اورتانو و همکاران (۱۹۹۷) اظهار داشتند که مقدار فلاونوئید نارنجین در میوه های نارس به مراتب بیشتر از مقدار آن در میوه های کاملاً رسیده است. آنها همچنین اظهار داشتند که اقلیم ، نوع کولیتوار و پایه روی مقدار فلاونوئیدها تأثیر داشته و بیشترین میزان نارنجین در گریپ فروت روی پایه نارنج گزارش شده است. نارنجین اهمیت زیادی در صنایع مدرن داروسازی دارد.

علت تلخی لیمو شیرین نارنجین و لیمونین است که در مجاورت هوا اکسید میشوند. نارنجین یکی از فلاونوئید هایی است که فرمول ساختاری آن به صورت زیر است:



نارنجین دارای اثرات ضد تومور و ضد سرطان سینه میباشد. نارنجین سبب حفاظت معده در مقابل زخم های ایجاد شده میشود. به عنوان آنتی اکسیدان و کاهش دهنده چربی خون اهمیت فراوانی دارد. در آزمایشات بر روی حیوانات ، نارنجین سبب افزایش کارائی جذب دارو ها برای فشار خون بالا میشود. در کشاورزی از نارنجین به عنوان محرک رشد برخی سبزیجات استفاده می گردد.

این ماده به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کرده و به سلول های بدن در محافظت از صدمات اکسیداتیو کمک می کند. دیده شده است که دارای ویژگی ضد سرطانی است بدون اینکه به سلول های بدن آسیب برساند. این ترکیب نوعی اسید زیستی می باشد و در برابر برخی سلول های سرطانی سیتوتوکسیک است بدون اینکه آسیبی به سلول های طبیعی وارد نماید.

مهار مسیر سیگنالینگ و RAS/MPK شاید ناشی از کاهش تهاجم نارنجین باشد. نارنجین به عنوان اثر مهار کنندگی به کار برده می شود. توانایی ضد ویروسی نارنجین به فعالیت انتی اکسیدانی مربوط است. لیگاند های باند EFGF متعاقبا فعالیت مسیر ERK/MEK و AKT/PI3K که به تهاجم و دیگر فنوتیپ های بد خیم کمک می کند. نارنجین به طور قابل توجهی تنظیم فسفریلاسیون دو عضو RAS/MAPK و PI3K/AKT مسیرهای انتقال سیگنال را کاهش می دهد همچنین در تکثیر سلول، تهاجم و بقا نقش دارد.

Wasowski c , PymLJ و همکارانش در سال ۲۰۱۲ بر روی فلاونوئید ها به عنوان لیگاندهای گیرنده GABA آزمایش کردند و دریافتند به طور خلاصه فلاونوئید های طبیعی و سنتتیک به عنوان لیگاند جایگاه اتصال بنزودیازپین ها داروهای موثر روی گیرنده های GABA اثرات سودمند روی سیستم عصبی مرکزی دارند در ضمن می توانند به عنوان ابزار برای مطالعه جایگاه های تنظیم کننده موجود در گیرنده های GABA و تولید داروهای GABA subtype-selective مورد استفاده قرار گیرند.()

Moon H.kim و همکارانش در سال ۲۰۱۲ بر روی سنتز و سنجش بیولوژیکی مهار کننده گیرنده تیروزین کینازی بررسی کردند. (۵۰)

بر طبق مطالعه انجام شده مشخص گردید که تاکنون برهمکنش FGFR2b با فلاونوئید هایی مانند نارنجین در مطالعه ای گزارش نشده است. بر این اساس در این مطالعه تغییرات ساختاری پروتئین

نو ترکیب FGFR2b بر اثر برهمکنش با نارجین با کمک تکنیک های اسپکتروسکوپی شامل فلوئورسانس بررسی می گردد.

### ۱-۳- گیرنده های تیروزین کینازی به عنوان یک هدف درمانی در سرطان

گیرنده های فاکتور رشد فیبروبلاستی متعلق به خانواده ای از گیرنده های تیروزین کینازی هستند. این گیرنده ها در مسیر پیام رسانی سلول نقش کلیدی در تنظیم فرآیندهای زیستی از جمله تکثیر سلولی، بقا، مهاجرت و تمایز سلولی ایفا می کنند (۶۲،۳۱). متابولیسم سلولی، ترمیم بافتی، رگ زایی و توسعه مراحل جنینی از جمله وظایفی هستند که در دوران جنینی و بزرگ سالی در بدن توسط این گیرنده ها با اتصال به عوامل رشد فیبروبلاستی (FGF) انجام می شوند. اشکال موتاسیون یافته گیرنده های عامل رشد فیبروبلاستی در سرطان های متعددی از جمله سرطان پستان، معده، پروستات، کولون، رحم و مولتیپل میلوما شناخته شده است (۵۱). اختلال در انتقال پیام این گیرنده ها با چندین اختلال آسیب شناسی انسانی مرتبط است، از جمله سندرم های اسکلتی مانند سندرم فایفر که به دلیل جهش در ناحیه کینازی پروتئین FGFR2 ایجاد می شود. مشخص شده است که اختلال تنظیمی مسیر پیام رسانی گیرنده های عامل رشد فیبروبلاستی (که می تواند ناشی از تغییرات ژنتیکی باشد) با ایجاد سرطان ارتباط تنگاتنگی دارد و این امر این گروه از کینازها را به عنوان یک هدف درمانی جالب توجه در درمان سرطان مطرح می کند.

این گیرنده ها دارای دو ایزو فرم b و c می باشند که هر کدام به ترتیب در بافت های اپی تلیال و مزانشیمال بیان می شوند. همچنین هفت گیرنده در خانواده ی گیرنده های فاکتور رشد فیبروبلاستی جای می گیرد که شامل FGFR1b، FGFR1c، FGFR2b، FGFR2c، FGFR3b، FGFR3c و FGFR4 می باشد (45). همه آن ها دارای یک بخش داخل غشایی، یک ناحیه خارج سلولی متصل شونده به لیگاند و یک ناحیه داخل سلولی که خاصیت تیروزین کینازی دارد هستند. گیرنده ی FGFR2b ایزو فرم اپی تلیال گیرنده ی فاکتور رشد فیبروبلاستی است. ناحیه ی کینازی FGFR2b متشکل از ۳۳۴ اسید آمینه می باشد و دارای ساختار به صورت دو ناحیه ی کینازی N-terminal و C-

terminal است که توسط یک ناحیه‌ی اتصال دهنده انعطاف پذیر به هم مرتبط می‌شوند این ناحیه‌ی اتصال دهنده حلقه‌ی فعال سازی نیز نامیده می‌شود که در عملکرد فسفریلاسیون تیروزین‌های ناحیه‌ی کینازی گیرنده نقش مهمی دارد. تقریباً ۲۰٪ ژن‌های انسانی محصولاتی را کد می‌کنند که در مسیرهای پیام‌رسانی (انتقال علامت) سلولی مشارکت دارند. تنظیم‌کننده‌های اصلی این مسیرها از طریق واکنش‌های فسفریلاسیون/دفسفریلاسیون عمل می‌نمایند. آنزیم‌های تیروزین کیناز دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که مسئول فسفریلاسیون اسیدآمینه تیروزین روی پروتئین هدف خود هستند. دو خانواده از آنزیم‌های تیروزین کیناز وجود دارد که عبارت از گیرنده‌های کینازی متصل به غشاء و کینازهای سیتوپلاسمی که گیرنده نیستند. ناحیه کاتالیتیکی از تیروزین کیناز شامل مکان اتصال به مولکول ATP ویژه و مکان اتصال به سوپسترا است (57).

ژن FGFR2b روی بازوی بلند کروموزوم شماره ده انسان (10q26) قرار گرفته است و ۲۱ اگزون دارد (۴۸). تغییرات ژنتیکی در این گیرنده با سرطان‌های اندومتریال، تخمدان و پستان در ارتباط است. قابل ذکر است که نوع جهش‌یافته گیرنده عامل رشد فیبروبلاستی در تعدادی از سرطان‌ها گزارش شده است که با افزایش پیام مرتبط با این گیرنده ارتباط دارد. با توجه به بررسی ما در متون علمی تاکنون گزارشی به دست نیامده که در آن با استفاده از روش ذکر شده در این مطالعه این پروتئین نوترکیب بیان شده باشد. قابل ذکر است که تهیه‌ی ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین FGFR2b به صورت خالص این امکان را فراهم کرد که در مطالعات بتوان اطلاعاتی راجع به ساختار و نیز بررسی برهمکنش پروتئین و لیگاند از جمله اثر مهارکننده‌های مختلف را روی ناحیه‌ی کینازی این پروتئین به دست آورد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بیان و خالص‌سازی و اثر برهم کنش با فلاونوئیدها از جمله نارنجین مقدار مناسبی از ناحیه کینازی FGFR2b انسانی انجام شد.



## ۱-۱-۴- فعال سازی کینازها از طریق ایجاد موتاسیون و راهکارهای درمانی سرطان از

### طریق مهار کینازها

جهش‌های نقطه‌ای در نواحی خارج سلولی، غشایی و سیتوپلاسمی باعث دایمریزاسیون و یا اتوفسفریلاسیون بدون ایجاد اتصال بین لیگاند و گیرنده می‌شوند. فعال سازی کینازها از طریق ایجاد موتاسیون باعث فعالیت کینازی مداوم این آنزیم‌ها می‌شود. مکانیسم‌هایی که این موتاژن آنزیمی را ایجاد می‌کنند شامل ترانسلوکاسیون کروموزومی یا موتاسیون های نقطه‌ای است که سبب تغییر در نواحی خارج سلولی، تغییر در ناحیه اتصال به ATP و تغییر در بخش کاتالیتیکی کیناز است. همه‌ی کینازها در فرم فعال از نظر کنفورماسیون شباهت زیادی با هم دارند در حالی که در فرم‌های غیر فعال از نظر ساختاری با یکدیگر متفاوت‌اند. آنکوژنیک تیروزین کینازها تنظیم فرایندهای سلولی را مختل و یک فنوتیپ پاتولوژیک ایجاد می‌کنند، بنابراین به نظر می‌رسد که این پروتئین‌ها به عنوان یک هدف درمانی جالب توجه برای درمان سرطان باشند (3).

دو رویکرد اصلی برای مهار فعالیت آنکوژنیک تیروزین کینازها وجود دارد. استراتژی اول استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال علیه ناحیه خارج سلولی این گیرنده هاست و دومی بر مبنای مولکول‌های کوچک است که با ناحیه‌ی اتصال به مولکول ATP واکنش می‌دهند و فعالیت کیناز داخل سلولی را مهار می‌کنند. در سال ۲۰۰۱ هرسپتین، به عنوان یک داروی ضد سرطان جدید که بازدارنده تیروزین کینازها بود برای آزمایش‌های بالینی معرفی شد. هرسپتین اولین آنتی‌بادی منوکلونال انسانی در برابر گیرنده تیروزین کیناز HER2/ne بود (اسلیکوسکی و همکارانش، ۱۹۹۹).

داروی Imatinib mesylate, Gleevec, STI-571 نیز که به طور اختصاصی فعالیت انکوژن تیروزین کیناز ABL/BCR را مهار می‌کرد و در درمان لوکمی موفقیت‌آمیز بود در سال ۲۰۰۱ به تأیید FDA رسید (27).

مثالی از مولکول‌های کوچک ترکیب PD173074 است که توانایی القای توقف چرخه سلولی را در سلول‌های سرطان اندومتر با FGFR2 جهش یافته دارد (15).

استراتژی درمانی دیگر استفاده از آنتی‌سنس RNA (asRNA) یا RNA کوچک مداخله گر (siRNA) است که ممکن است بیان ژن هدف ویژه‌ای را که در پیشرفت سرطان دخیل است را به طور انتخابی مهار کنند (32). مزیت استفاده از مولکول‌های siRNA به اختصاصیت بالای آن‌ها در اتصال به رونوشت‌های mRNA منحصر به فردی است که فقط در سلول‌های سرطانی ممکن است وجود داشته باشند می‌باشد، که گاهی اوقات تنها تفاوت آن‌ها با رونوشت اصلی (Wild type) توسط یک جهش نقطه‌ای واحد ایجاد می‌شود (۲۲). در این تحقیق ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین FGFR2b که دارای جهش‌های مورد نظر می‌باشد در برهمکنش با فلاونوئیدها مورد مطالعه قرار گرفته است.

## ۲-۱- ضرورت انجام تحقیق

در مطالعات انجام گرفته چندین جهش افزایش انتقال پیام در ناحیه‌ی کینازی FGFR2b در سرطان‌های اندومتریال، تخمدان و پستان شناسایی گردیده است. همچنین مشخص شده است که اختلال تنظیمی مسیر پیام‌رسانی گیرنده‌های فاکتور رشد فیبروبلاستی که می‌تواند ناشی از تغییرات ژنتیکی باشد با ایجاد سرطان ارتباط تنگاتنگی دارد. بنابراین این امر این گروه از کینازها را به عنوان یک هدف درمانی جالب توجه در درمان سرطان مطرح می‌کند. کاربرد مهارکننده‌های گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی نظیر PD۱۷۳۰۷۴ بر روی رده‌های سلولی سرطانی و نتایج موفقیت‌آمیز حاصل از آن در مهار تکثیر سلولی، مورد هدف قراردادن این کینازها را در درمان سرطان تأیید می‌کند. در سال‌های اخیر چندین مهارکننده‌ی گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ارائه شده است که نشان دهنده‌ی سطح بالای توجه محققان به این گیرنده‌ها با رویکرد ضدسرطانی آن‌ها می‌باشد (33,47).

در حال حاضر یکی از اهداف عمده در فارماکولوژی مولکولی کشف مهارکننده‌هایی است که به صورت انتخابی با آنکوژنیک تیروزین کیناز اینتراکشن برقرار می‌کنند. فلاونوئیدها از جمله ترکیباتی هستند که در سالهای اخیر اثر ضدسرطانی و ضد التهابی آنها مطرح شده است. بر طبق مطالعه انجام شده مشخص گردید که تاکنون برهمکنش FGFR2b با فلاونوئیدهایی مانند نارنجین در مطالعه ای گزارش نشده است. بر این اساس در این مطالعه تغییرات ساختاری پروتئین نوترکیب FGFR2b بر اثر برهمکنش با نارنجین با کمک تکنیک های اسپکتروسکوپی شامل فلورئورسانس بررسی می‌گردد.

### ۱-۳- اهداف و فرضیات تحقیق

#### ۱-۳-۱ هدف اصلی

بررسی max و min غلظت اثر نارنجین از خانواده فلاونوئیدها بر ساختار ناحیه کینازی رسپتور فاکتور رشد فیبروبلاستی نوع دوم.

#### ۱-۳-۲ اهداف فرعی

- ۱- ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب به داخل E.coli .
- ۲- بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب FGFR2b
- ۳- تعیین اثر نارنجین بر روی ساختار سوم پروتئین تخلیص شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوریمتری

#### ۱-۳-۳ اهداف کاربردی

مشخص شدن عوامل موثر در تغییر ساختار پروتئین نوترکیب FGFR2b می‌تواند در درمان برخی سرطان ها موثر باشد. بهره وران نتایج کاربردی این تحقیق دانشگاه های علوم پزشکی و مراکز تحقیقات دارویی و سرطان می باشند.

### ۴-۳-۱- فرضیات تحقیق

- پروتئین نوترکیب در باکتری E.coli بیان می‌شود.
- پروتئین نوترکیب توسط کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص می‌شود.
- ساختار ناحیه کینازی پروتئین جهش یافته نوترکیب FGFR2b در برهمکنش با نارنجین تغییر می‌کند.

### ۴-۱- تعریف متغیرها

جدول ۱-۱- جدول متغیرها

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پیوسته	گسسته	اسمی	رتبه ای		
پروتئین نوترکیب FGFR2b		+		+			پروتئین تولید شده به روش مهندسی ژنتیک	بر اساس تغییرات جذب نور UV
فلاونوئید نارنجین	+		+				نوعی فلاونوئید گیاهی	میکروگرم بر میلی لیتر

## ١-٥ - تعريف اصطلاحات

**AB:** Acid Box

**ATP:** Adenosine Triphosphate

**AsRNA:** antisense RNA

**APS:** Ammonium Persulfate

**CD:** Circular Dichroism

**CAMs:** Calcium-Modulated Protein

**CHO:** Chinese hamster ovary

**DHA:** Docosahexaenoic acid

**DAG:** diacylglycerol

**EPA:** eicosapentaenoic acid

**ERK:** Extracellular Signal-Regulated Kinases

**EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor

**FGFR2b KD:** Fibroblast Growth Factor Receptor 2b kinase domain

**FGFR:** Fibroblast Growth Factor Receptor

**FGF:** Fibroblast Growth Factor

**FDA:** Food and Drug Administration

**FRS2:** factor receptor substrate 2

**FGFBP:** fibroblast growth factor binding protein

**NAR:** Nrinjin

**GDP:** guanidine di-phosphate

**GTP:** guanidine tri-phosphate

**GRB2:** growth factor receptor-bound protein 2

**Gab1:** Grb2-associated binder-1

**GST:** Glutathione S-Transferase

**GdnHCl:** Guanidinium Hydrochloride

**HSGAG:** Heparan Sulfate Glycosaminoglycan

**HEPES:** Hydroxyethyl-Piperazine Ethanesulfonic Acid

**IPTG:** Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

**IGFR:** Insulin-Like Growth Factor Receptor

**Itk:** interleukin-2inducible T cell kinase

**LADD:** Lacrimo-auriculo-dento-digital  
**MBP:** Maltose-Binding Protein  
**MAPK:** mitogen-activated protein kinase  
**Ni<sup>2+</sup>-NTA:** Ni (2+)-Nitrilotriacetic Acid  
**NF-Kb:** nuclear factor kappa beta  
**NMR:** Nuclear magnetic resonance  
**PDGFR:** Platelet-Derived Growth Factor Receptor  
**pLEICS-01:** Plasmid Leicester-01  
**PTP:** Protein-Tyrosine Phosphatase  
**PMT:** Photomultiplier tubes  
**PLC $\gamma$ :** phospholipase C $\gamma$   
**PI3:** Phosphatidylinositol-3  
**RTK:** Receptor Tyrosine Kinase  
  
**Ras/MAP Kinase:** Ras/mitogen activated protein kinase  
**RNA:** Ribo nucleic acid  
**Raf:** rapidly accelerated fibrosarcoma  
**SiRNA:** Small interfering RNA  
**Electrophoresis PAGE SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel  
**SH3:** Src homology 3  
**TRPC3:** canonical transient receptor potential protein 3  
**SUMO:** Small ubiquitin-related modifier  
**TEMED:** N, N, N', N' - tetramethylethylenediamine  
**XFLRT3:** Xenopus laevis ortholog of FLRT3

## فصل دوم: پیشینه تحقیق

## ۲-۱- مروری بر مطالعات انجام شده

### ۲-۱-۱- ارتباط ساختار و عملکرد پروتئین‌ها

پروتئین‌ها مولکول‌های زیستی متشکل از یک یا چند زنجیره‌ی پلی‌پپتیدی تا خورده به شکل کروی یا فیبری هستند که برای بسیاری از عملکردهای بیولوژی در سیستم حیاتی ضروری هستند. همچنین یک پلی‌پپتید، زنجیره واحدی از پلیمرهای خطی است که در آن آمینواسیدها با پیوند پپتیدی کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. در طبیعت ۲۰ نوع اسیدآمینه یافت می‌شود و ساختار اولیه پروتئین‌ها از ترکیب همین ۲۰ نوع اسیدآمینه ایجاد می‌شود. همچنین از نظر سطوح ساختاری چهار سطح ساختاری مجزا در پروتئین‌ها دیده می‌شود.

در سطح اول، ساختار اولیه پروتئین‌ها قرار دارد که اشاره به توالی مختلف اسیدهای آمینه یک پلی‌پپتید یا پروتئین دارد. آمینواسیدها در ساختار اولیه توسط پیوند کووالانسی یا پپتیدی به یکدیگر متصل شده‌اند. این پیوندهای طی فرآیند ترجمه یا بیوسنتز پروتئین ساخته می‌شوند.

سطح دوم یا ساختار ثانویه شامل مارپیچ‌های آلفا، صفحات بتا و چرخش بتا هستند. در این سطح عامل پایدار کننده‌ی ساختاری پیوندهای هیدروژنی هستند.

ساختار سوم نمای کلی از یک مولکول پروتئینی منفرد را نشان می‌دهد. ساختار سوم توسط پیوندهای غیر کوآلان پایدار می‌شود. به طور معمول تشکیل هسته‌ی هیدروفوبیک، پیوندهای نمکی، پیوندهای هیدروژنی، باندهای دی سولفیدی و نیز بسیاری از تغییرات پس از ترجمه در این سطح ساختاری نمایان می‌شوند. در واقع این ساختار سوم است که عملکرد پایه‌ای یک پروتئین را کنترل می‌کند.

آخرین سطح، ساختار چهارم پروتئین است. این ساختار توسط چندین مولکول پروتئینی یا زنجیره‌ی پلی‌پپتیدی شکل می‌گیرد که هر کدام از اینها یک زیر واحد پروتئینی نامیده می‌شوند و یک مجموعه پروتئینی واحد ایجاد می‌کنند (۵۵)

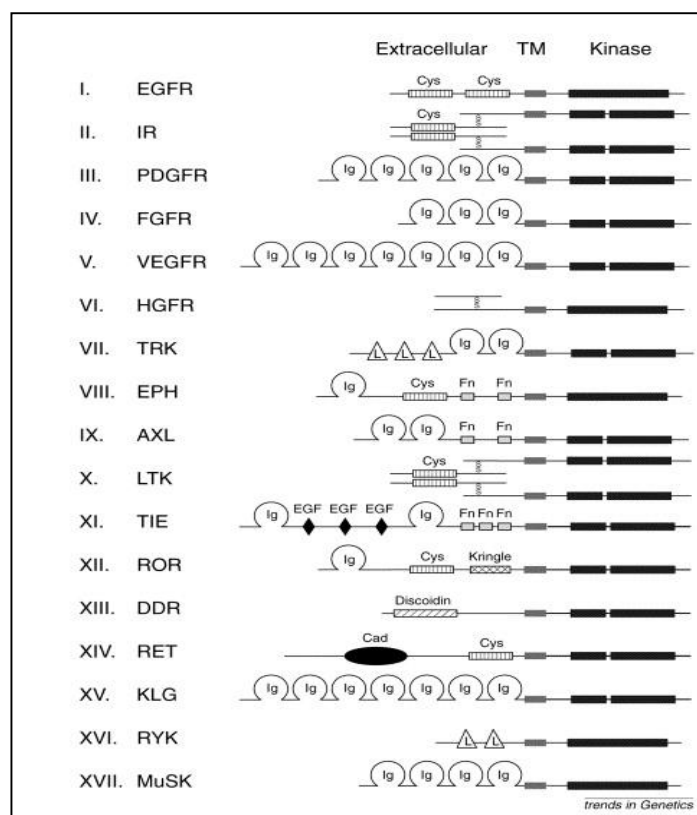


## ۲-۱-۲- گیرنده‌های تیروزین کینازی

تعداد ۵۱۸ پروتئین کیناز در ژنوم انسان وجود دارد که این میزان حدود ۱/۷ درصد از کل ژنوم انسانی است. ۹۰ مورد از این تعداد شامل تیروزین کینازهایی هستند که نقش اصلی در پیام‌رسانی داخل سلولی ایفا می‌کنند. علاوه بر این، تیروزین کینازها مهم‌ترین گروه خانوادگی کینازها هستند که در بیولوژی سرطان مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. این ۹۰ تیروزین کیناز در انسان به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند.

گروه اول، گیرنده‌ی تیروزین کینازی متصل به غشا هستند و شامل ۵۸ مورد می‌شوند. گروه دوم، تیروزین کینازهای سیتوپلاسمی هستند که گیرنده نیستند، این گروه شامل ۳۲ مورد می‌شود.

گیرنده‌های تیروزین کیناز براساس ساختار ناحیه‌ی خارج سلولی شان به ۲۰ خانواده تقسیم می‌شوند (شکل ۱-۱). همچنین گیرنده‌ی فاکتور رشد فیبروبلاستی متعلق به خانوادگی گیرنده‌های تیروزین کینازی است (42).

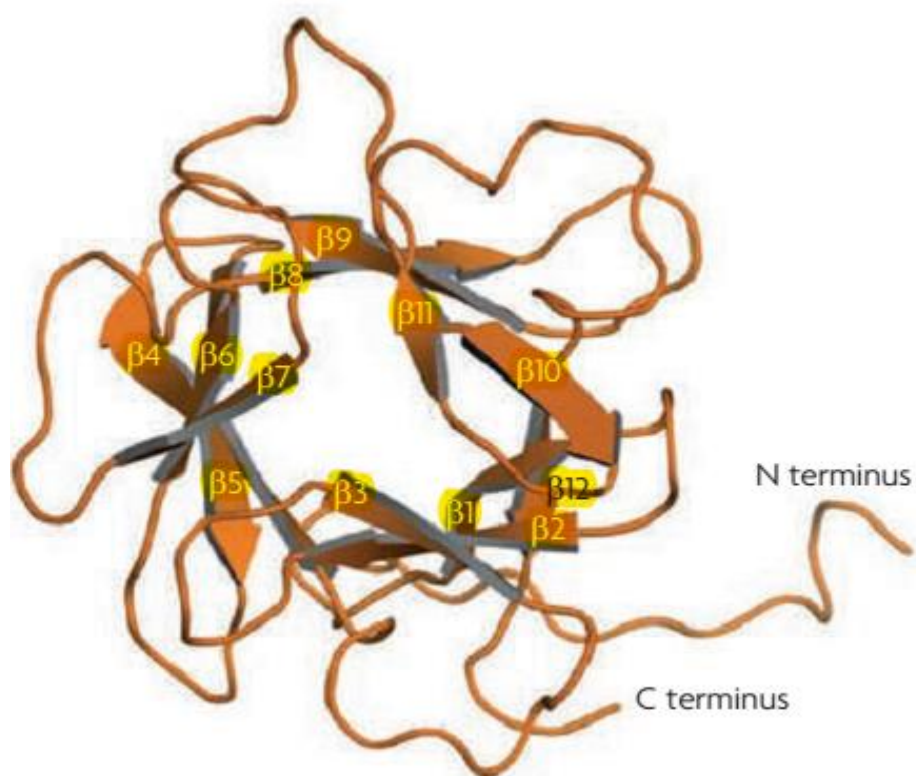


شکل ۲-۱- دسته بندی گیرنده های تیروزین کینازی.

گیرنده های تیروزین کیناز براساس ساختار ناحیه ی خارج سلولی شان به ۲۰ خانواده تقسیم میشوند. هر گیرنده سه ناحیه دارد. ناحیه خارج سلولی، ناحیه گذرنده از غشا و ناحیه کینازی داخل سیتوپلاسمی. گیرنده های فاکتور رشد فیبروبلاستی در دسته چهارم این خانواده قرار دارند.

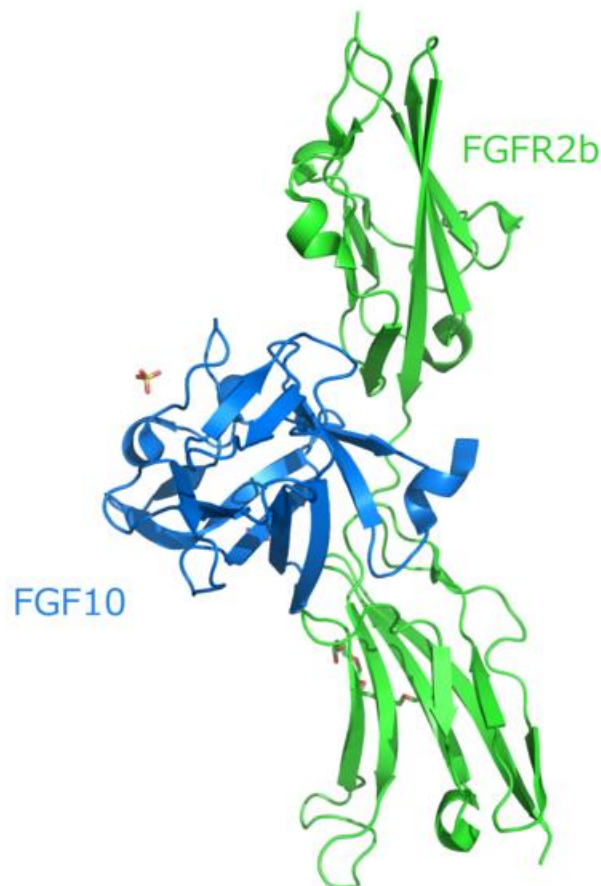
## ۳-۱-۲- فاکتورهای رشد فیبروبلاستی

فاکتورهای رشد فیبروبلاست (FGF) یک ناحیه ی هسته ای همولوگ دارند که شامل ۱۲۰ الی ۱۳۰ اسیدآمینو است. این ناحیه از کنار هم قرار گرفتن ۱۲ رشته ی  $\beta$  ناهمسو (آنتی پارالل) ( $\beta 1-\beta 12$ ) تشکیل شده است (شکل ۱-۲). محل اتصال هپاران سولفات گلیکوزآمینوگلیکان (HSGAG) در ناحیه هسته ای پروتئین های فاکتورهای رشد فیبروبلاست، متشکل از حلقه  $\beta 1-\beta 2$  و قطعاتی از منطقه دربرگیرنده ی  $\beta 10$  و  $\beta 12$  است. یک واحد عملکردی کمپلکس FGF-FGFR متشکل از دو کمپلکس FGF-FGFR-HSGAG با نسبت ۱:۱:۱ است که به صورت دایمر متقارن کنار یکدیگر قرار می گیرند. در این دایمر هر لیگاند به طور هم زمان به هر دو گیرنده متصل می شود و هر دو گیرنده نیز با یک دیگر در ناحیه  $\beta 2$  به طور مستقیم در تماس هستند. ساختار کریستالی کمپلکس FGF10-FGFR2b در شکل (۱-۳) نشان داده شده است. هپاران سولفات گلیکوزآمینوگلیکان متصل به انتهای دیستال غشایی دایمر موجب تقویت اتصال پروتئین-پروتئین می شود. این نواحی علاوه بر تسهیل اتصال FGF-FGFR، موجب تثبیت پروتئین های فاکتورهای رشد فیبروبلاست در برابر تجزیه می شوند و به عنوان یک مخزن ذخیره سازی لیگاند عمل می کنند. علاوه بر این ناحیه دیگری به نام پروتئین اتصال به فاکتورهای رشد فیبروبلاست (FGFBP) که یک پروتئین حامل است می تواند پروتئین های فاکتورهای رشد فیبروبلاست را از طریق آزادسازی آن ها از ماتریس خارج سلولی، یعنی در جایی که آن ها توسط اتصال به هپاران سولفات گلیکوزآمینوگلیکان محدود شده اند فعال سازد. مشاهده شده است که پروتئین اتصال موجب افزایش تکثیر سلول های فیبروبلاست وابسته به FGF2 می شود و یک نقش مهمی در پیشرفت بعضی از سرطان ها دارد (9).



شکل ۲-۲- ساختار فاکتورهای رشد فیبروبلاست.

۱۲ رشته‌ی  $\beta$  ناهمسو (آنتی‌پارالل) ( $\beta 1$ - $\beta 12$ ) به رنگ زرد و هم‌چنین دو انتهای کربوکسیلی فاکتورهای رشد فیبروبلاستی ۱ با رنگ سیاه، نشان داده شده است.



شکل ۲-۳ - ساختار کریستالی کمپلکس FGF10-FGFR2b.

ناحیه اتصال فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱۰ به نواحی قسمت خارج سلولی گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی 2b در شکل نشان داده شده است.

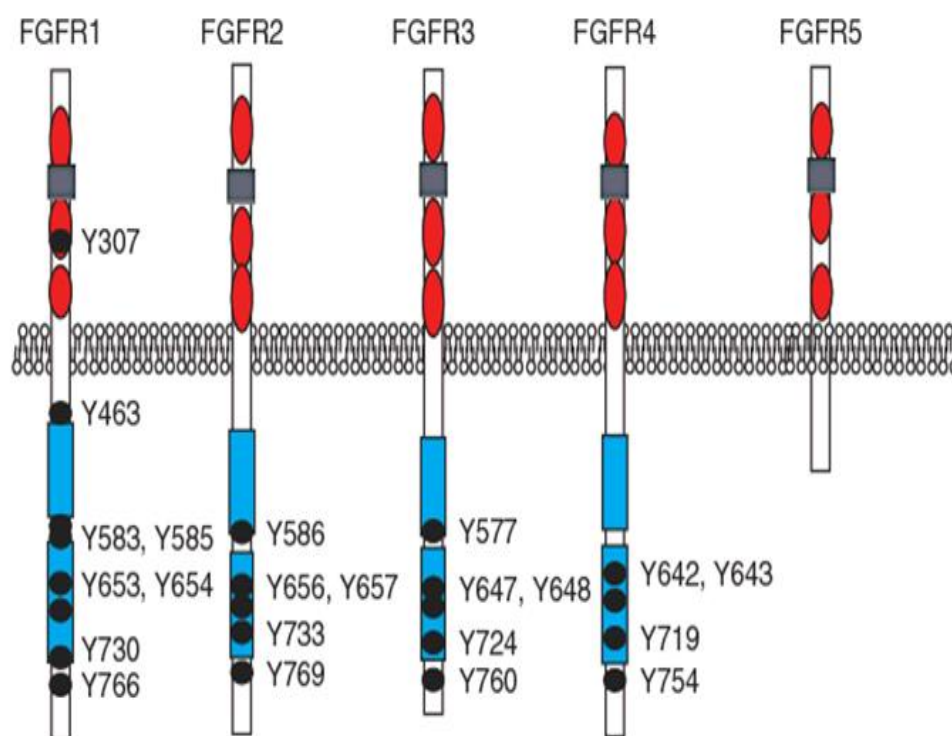
## ۲-۱-۴ - گیرنده‌های فاکتور رشد فیبروبلاستی

فاکتورهای رشد فیبروبلاست پستانداران (FGFs) شامل خانواده‌ای از ۱۸ عضو هستند (FGF1-FGF10) و (FGF16-FGF23). این فاکتورها از طریق چهار گیرنده تیروزین کینازی (FGFR1-FGFR4) و ایزوفرم‌های آنها پیام سلولی ایجاد می‌کنند و از این طریق رشد و نمو جنین و سوخت و ساز بدن بزرگسالان را تنظیم می‌کنند. انتقال پیام کنترل نشده فاکتور رشد فیبروبلاست می‌تواند منجر به

بدخیمی‌های انسانی شود (38). پروتئین‌های گیرنده‌ی فاکتور رشد فیبروبلاستی متعلق به خانواده‌ای از گیرنده‌های تیروزین کیناز (RTK) هستند و همه آنها یک بخش داخل غشایی، یک ناحیه خارج سلولی متصل شونده به لیگاند، و یک ناحیه داخل سلولی با خاصیت تیروزین کینازی دارند. قسمت خارج سلولی یک گیرنده‌ی فاکتور رشد فیبروبلاستی اولیه شامل سه ناحیه (Domain) شبه ایمونوگلوبولین (Ig)، (D1، D2 و D3) است که توسط اتصال‌دهنده‌های انعطاف پذیر به یکدیگر متصل شده‌اند. از ویژگی‌های منحصر به فرد گیرنده‌ی فاکتور رشد فیبروبلاستی وجود توالی غنی از گلوتامات، آسپاراتات، سرین در ناحیه‌ی اتصال D1-D2 است که جعبه AB (Acid Box) نامیده می‌شوند. موقعیت ریشه-های تیروزین، جعبه اسیدی و هم چنین نواحی شبه ایمونوگلوبولین گیرنده در شکل (۱-۴) نشان داده شده است (45,75). همچنین دو مکان اتصال برای فاکتور رشد فیبروبلاست، یک مکان اتصال به هپارین و یک سایت تعامل گیرنده-گیرنده در D2 و D3 این گیرنده‌ها شناسایی شده است. اتصال مولکول‌های فاکتور رشد فیبروبلاست به گیرنده‌ی فاکتور رشد فیبروبلاستی باعث جفت شدن (دایمریزاسیون) گیرنده و به دنبال آن ترانس فسفریلاسیون تیروزین موجود در حلقه‌ی فعال‌سازی ناحیه کینازی می‌شود. متعاقب آن قسمت انتهایی کربوکسیل (COOH-terminal) گیرنده فسفریله می‌شود. در نتیجه گیرنده فعال شده و پروتئین‌های داخل سلولی مثل FRS2 (FGFR substrate) (2) را نیز فسفریله و فعال می‌کند. در نهایت شبکه‌ی انتقال پیام (سیگنالینگ) داخل سلولی القاء می‌شود که فرآیندهای بیولوژیکی کلیدی مانند تکثیر سلولی، بقا، مهاجرت و تمایز را به طور دقیق تنظیم می‌کنند (5,58).

در مجموع هفت گیرنده‌ی فاکتور رشد فیبروبلاستی اصلی شامل FGFR1b، FGFR1c، FGFR2b، FGFR2c، FGFR3b، FGFR3c و FGFR4 داخل سلول وجود دارد. ایزوفرم b معمولاً در بافت اپی‌تلیال بیان می‌شود در حالی که ایزوفرم c معمولاً در بافت مزانشیمی بیان می‌شود. لیگاندها در هر دو بافت اپی‌تلیال و مزانشیمی تولید می‌شوند و به طور کلی گیرنده‌های بافت مخالف خاص خود را فعال می‌کنند. در شرایط فیزیولوژیکی طبیعی یک لیگاند تولید شده در اپی‌تلیوم، گیرنده

مزانشیمی را فعال می‌کند و برعکس. در وضعیت‌های پاتولوژیک این اتصال اختصاصی لیگاند و گیرنده از بین می‌رود که این امر در سرطان‌هایی شایع است که بیان بیش از اندازه‌ی پروتئین‌های فاکتور رشد فیبروبلاستی در آنها مشاهده می‌شود (68,36).



شکل ۲-۴- گیرنده‌های فاکتور رشد فیبروبلاستی و نواحی فسفریله شدن آن.

موقعیت ریشه‌های تیروزین روی بخش داخل سلولی گیرنده با دایره‌های سیاه رنگ نشان داده شده است. نواحی شبه ایمونوگلوبولین D1, D2, D3 در قسمت خارج سلولی گیرنده با رنگ قرمز و ناحیه Acid Box با رنگ آبی در شکل نشان داده شده است.

## ۲-۱-۵- گیرنده‌های فاکتورهای رشد فیبروبلاستی و اختلالات پاتولوژیکی

عدم تعادل در انتقال پیام (سیگنالینگ) گیرنده‌های فاکتورهای رشد فیبروبلاستی با چندین اختلال پاتولوژیکی انسانی مرتبط است مانند سندرم‌های اسکلتی از جمله سندرم کروزون Crouzon و سندرم فایفر Pfeiffer که به دلیل جهش در ناحیه کینازی پروتئین FGFR2 ایجاد می‌شوند (کان و

همکارانش، ۲۰۱۲)، سندرم کالمن که می‌توان آن را به جهش در FGFR1 نسبت داد (۲۶). سندرم LADD که به دلیل کاهش عملکرد ناحیه کینازی FGFR2 و FGFR3 ایجاد می‌شود (73) و نیز برخی از سرطان‌ها. در سرطان‌های انسانی پروتئین‌های گیرنده‌های فاکتورهای رشد فیبروبلاستی توسط مکانیسم‌های مختلف نامنظم می‌شوند از جمله بیان نابجا، جهش، امپلیفیکاسیون و بازآرایی‌های کروموزومی. چندین تغییر ژنتیکی و جهش درون خانواده‌ی گیرنده‌های فاکتور رشد فیبروبلاستی شناسایی شده‌اند. تغییرات ژنتیکی که فنوتیپ سرطانی را ایجاد می‌کنند شامل جهش حذفی، جهش افزایش عملکرد، جهش ازدست دادن عملکرد و امپلیفیکاسیون است (58).

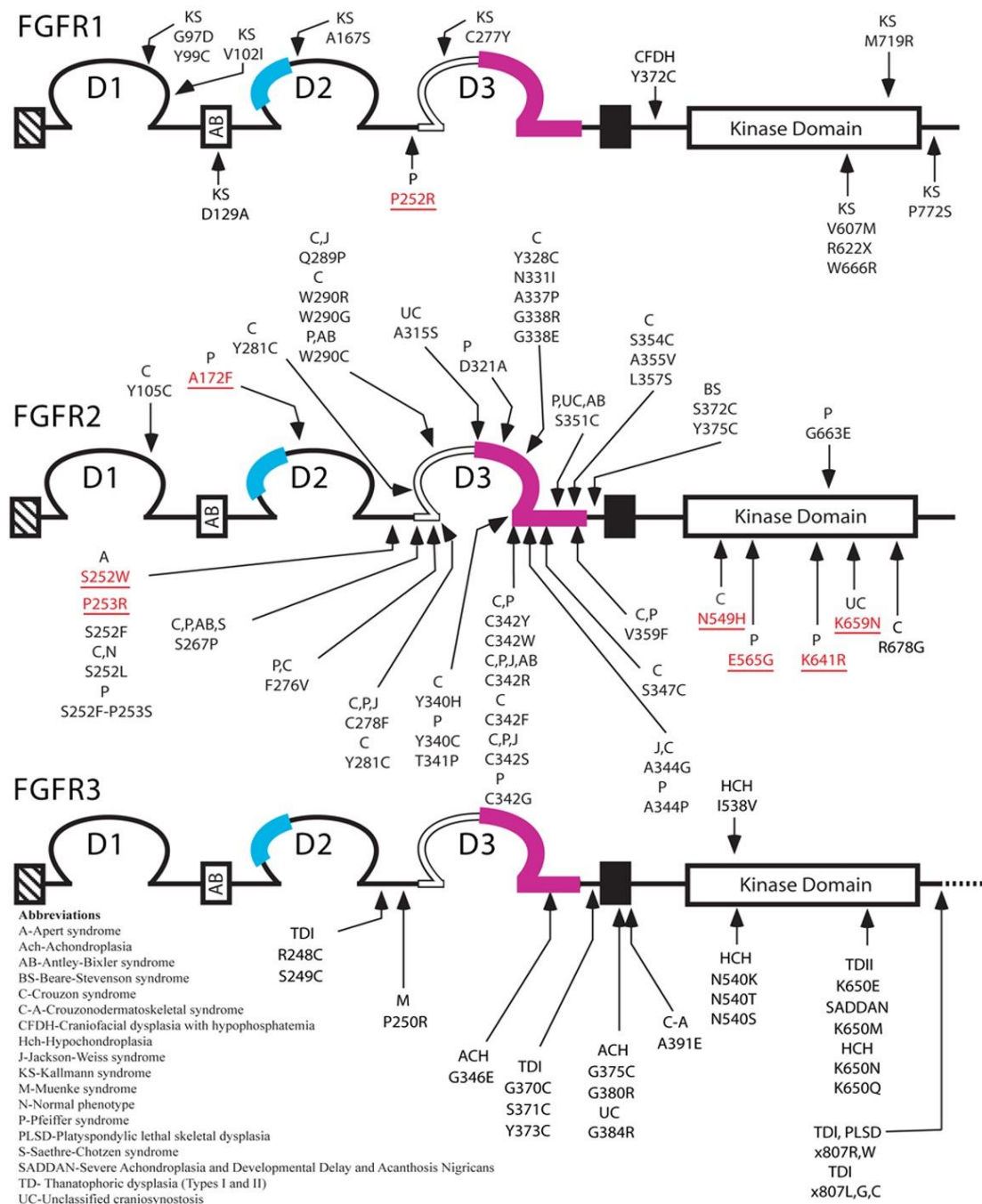
فرم‌های جهش یافته‌ی پروتئین‌های گیرنده‌های فاکتورهای رشد فیبروبلاستی در سرطان‌های متعددی از جمله سرطان ریه، پستان، معده، مغز، سر و گردن، پروستات، کولون، رحم، مثانه و همچنین مولتیپل میلوما شناخته شده است (35).

جهش‌های افزایش عملکرد در پروتئین‌های گیرنده‌های فاکتورهای رشد فیبروبلاستی مسئول بیماری‌های مختلف از جمله کرانیوستوزیس Craniosynostosis، سندرم کوتولگی و برخی از سرطان‌ها است. اغلب جهش‌ها در پروتئین‌های گیرنده‌های فاکتورهای رشد فیبروبلاستی مستقل از لیگاند هستند اما در بعضی موارد مانند Ser252Trp و Pro253Arg در اکتودومین مولکول FGFR2 تنها در هنگام اتصال لیگاند اثرشان ظاهر می‌شود. این جهش‌ها باعث سندرم آپرت از طریق افزایش تمایل اتصال لیگاند و از طرفی بالا رفتن میزان اتصال نامناسب لیگاندها به گیرنده‌های خود می‌شود (41).

جهش‌های ناحیه‌ی گذرنده از غشا، مانند Gly380Arg در FGFR3، اینتراکشن غیرکوالانسی بین هلیکس‌های گذرنده از غشا را زیاد می‌کند و تقریباً در همه‌ی موارد آکنودروپلازیا که شایع‌ترین فرم ژنتیکی کوتولگی است دیده می‌شود (83).

جهش‌هایی که منجر به بیان بیش از اندازه و افزایش عملکرد FGFR3 می‌شوند در مولتیپل میلوما که یک بدخیمی غیرقابل درمان سلول‌های B است رخ می‌دهد (8). FGFR4 ارزش بالقوه‌ای به عنوان یک مارکر پیش آگهی در سرطان دارد. **Arg388** در FGFR4 با افزایش پیش‌روی سرطان پروستات مرتبط است، این پروتئین با افزایش تحرک و تهاجم سلولی موجب افزایش متاستاز می‌شود (82). برخی از این جهش‌ها ی نقطه ای به همراه اختلالات پاتولوژیکی مربوطه در شکل (۲-۵) نشان داده شده‌اند.





شکل ۲-۵- موتاسیون ها نقطه ای پاتولوژیک گیرنده ی فاکتور رشد فیبروبلاستی.

این جهش ها در نواحی مختلف خارج سلولی، ناحیه گذرنده از غشا و ناحیه کینازی گیرنده های FGFR1,2,3 به همراه اختلال پاتولوژیکی مرتبط با جهش مورد نظر با علامت فلش در شکل مشخص شده‌اند.

## ۲-۲- مسیر پیام‌رسانی سلولی فاکتورهای رشد فیبروبلاستی

با اتصال فاکتورهای رشد فیبروبلاستی به گیرنده‌های آن‌ها مسیر پیام‌رسانی FGF آغاز می‌شود. هپارین موجود در ماتریکس خارج سلولی و یا پروتئوگلیکان‌هایی که در سطح سلول حضور دارند این اتصال را تسهیل می‌کنند. به دنبال این اتصال دایمریزاسیون گیرنده رخ می‌دهد و متعاقب آن تیروزین‌های موجود در خود گیرنده توسط ناحیه‌ی کینازی آن فسفریله می‌شوند این فرآیند اتوفسفریلاسیون نامیده می‌شود. همچنین فسفریله شدن ناحیه داخل سلولی محل مناسبی را برای اتصال مولکول‌های پایین دست گیرنده نظیر فسفولیپاز C $\gamma$  و نیز Src کینازها فراهم می‌کند. مولکول دیگری که فسفریله و فعال می‌شود سوپسترای دوم گیرنده‌ی فاکتور رشد فیبروبلاستی یا (FRS2) می‌باشد شکل (۲-۶). از طریق این مولکول‌ها سه مسیر متفاوت زیر فعال می‌گردند (9).

### ۲-۲-۱- مسیر Ras/MAP Kinase

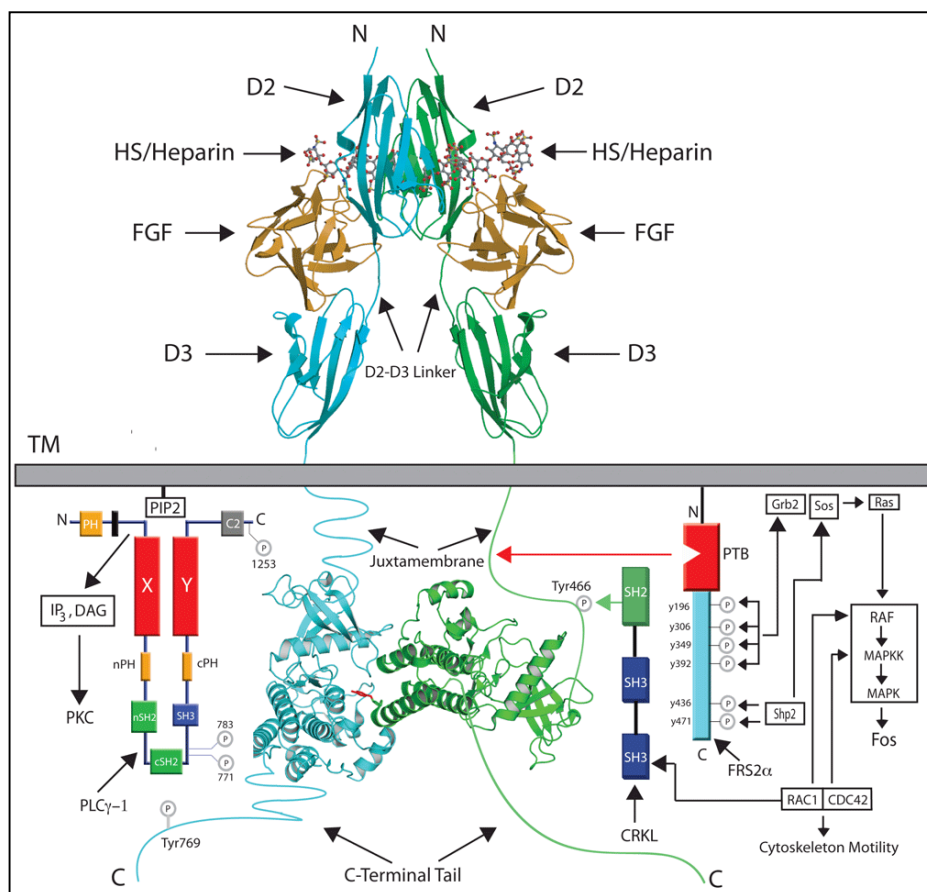
یکی از مولکول‌های مسیر پیام‌رسانی فاکتور رشد فیبروبلاست، داکینگ مولکول FRS2 می‌باشد (52). نقش این مولکول کنار هم قرار دادن پروتئین‌ها برای هر دو مسیر MAP کیناز و PI3 کیناز می‌باشد (79). پس از فعال شدن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاست، ناحیه تیروزین کیناز این گیرنده، ریشه‌ی تیروزین موجود در FRS2 را فسفریله می‌کند. این مراحل محلی مناسب برای اتصال مولکول‌های آداپتور نظیر (GRB2) فراهم می‌کند. خود مولکول (GRB2) شامل نواحی (SH3) یا (PTP) می‌باشد (60). هم‌چنین مولکول (SOS) از طریق ناحیه‌ی (SH3) به مولکول (GRB2) متصل می‌شود. مولکول SOS یک فاکتور تبادل نوکلئوتید گوانین است که پس از تشکیل کمپلکس با GRB2 قادر است مولکول Ras را فعال کند. فعال شدن Ras توسط SOS با تعویض GDP با GTP صورت می‌پذیرد. با فعال شدن Ras این مولکول قادر است با فاکتور پروتئین‌هایی نظیر Raf برهم کنش دهد و بدین ترتیب آبشارمسیر پیام‌رسانی MAP کیناز فعال می‌گردد. این مسیر در چرخه سلولی نقش دارد و فعالیت‌های بیولوژیکی نظیر بقا، مهاجرت، تکثیر و مرگ سلولی را موجب می‌شود (87 و 34).

## ۲-۲-۲ مسیر $PLC\gamma/Ca^{+2}$

پس از فسفریله شدن ناحیه داخل سلولی گیرنده‌ی فاکتور رشد فیبروبلاستی، مولکول فسفولیپاز  $C\gamma$  به تیروزین فسفریله شده ریشه‌ی ۷۶۶ در  $FGFR1$  متصل می‌گردد و توسط ناحیه‌ی تیروزین کینازی گیرنده فسفریله می‌شود. در واقع نقش مسیر پیام‌رسانی فاکتور رشد فیبروبلاستی در فعال شدن مسیر  $PLC\gamma/Ca^{2+}$  از طریق ایجاد جهش‌های خاص در گیرنده‌ی فاکتور رشد فیبروبلاستی مشخص گردیده است. زمانی که  $PLC\gamma$  فعال می‌شود قادر است فسفاتیدیل اینوزیتول ۴ و ۵ دی فسفات را به دو مولکول دی آسیل گلیسرول ( $DAG$ ) و نیز اینوزیتول ۱ و ۴ و ۵ تری فسفات ( $IP3$ ) هیدرولیز کند. هر دو این مولکول‌های پیام‌رسان ثانویه در تنظیم غلظت کلسیم داخل سلولی نقش دارند. مولکول  $DAG$  پروتئین کیناز  $C$  را فعال می‌کند و  $PI3$  تنظیم کلسیم داخل سلولی را بر عهده دارد (۲۱).

## ۲-۲-۳ مسیر $PL_3$ Kinase/ Akt

این مسیر از طریق سه مکانیسمی که در مسیر پایین دست گیرنده‌ی فاکتور رشد فیبروبلاستی قرار دارند فعال می‌شود. این مسیر یا می‌تواند به طور مستقیم توسط گیرنده فعال گردد و یا به طور غیر مستقیم از طریق  $Gab1$  و یا  $Ras$ . هم چنین  $Akt$  یا پروتئین کیناز  $B$  توسط  $PI3$  کیناز فعال می‌شود. در اغلب موارد در مراحل رشد و توسعه سلولی دو مسیر  $PI3$  kinase/ Akt و  $Ras/MAP$  کیناز به موازات یکدیگر عمل می‌کنند (49).



شکل ۲-۶- مسیر پیام‌رسانی گیرنده‌های فاکتور رشد فیبروبلاستی.

فسفولیپاز  $C\gamma$  و سوسترای دوم گیرنده ی فاکتور رشد فیبروبلاستی یا (FRS2) به عنوان دو مولکول هدف داخل سلولی اصلی برای این گیرنده ها در شکل نشان داده شده است.

با اتصال فاکتورهای رشد فیبروبلاستی به گیرنده های آن مسیر پیام‌رسانی FGF آغاز می‌شود. به دنبال این اتصال دایمریزاسیون و متعاقب آن اتوفسفریلاسیون گیرنده رخ می‌دهد سپس با اتصال مولکول‌های پایین دست گیرنده نظیر فسفولیپاز  $C\gamma$  ، Src ، کینازها و (FRS2) پیام داخل‌سلولی ایجاد می‌شود.

## ۲-۴-۲- تنظیم مسیر پیام‌رسانی فاکتورهای رشد فیبروبلاستی

مسیر پیام‌رسانی فاکتور رشد فیبروبلاستی توسط یکسری سیگنال‌های مثبت و منفی تنظیم می‌شود. بسیاری از این سیگنال‌های تنظیمی بین تمام گیرنده‌های تیروزین کیناز مشترک است و بسیاری نیز خاص مسیر پیام‌رسانی فاکتور رشد فیبروبلاستی است. هم‌چنین فاکتور رشد فیبروبلاستی بیان بعضی از مولکول‌های تنظیمی خود را تحت کنترل دارد. در نتیجه بسیاری از آن‌ها به طور هم‌زمان با فاکتور رشد فیبروبلاستی بیان می‌شوند (65).

این تنظیمات در سطوح مختلف سلولی نظیر سطح خارج سلولی، سطح گذرنده از غشاء و سطح داخل سلولی رخ می‌دهد. در سطح خارج سلولی، هپارین سولفات پروتئوگلیکان‌ها نقش مهمی را در تنظیم تعامل بین فاکتور رشد فیبروبلاستی و گیرنده بازی می‌کنند. هپارین سولفات پروتئوگلیکان‌ها عبارتند از گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفاته که به طور کووالانسی به پروتئین اصلی متصل شده‌اند و یک ساختار بسیار متنوع را بر مبنای توالی گلیکوزآمینوگلیکان‌های خود تشکیل می‌دهند (12). به منظور شکل‌گیری مطلوب‌ترین ساختار از تعامل بین فاکتور رشد فیبروبلاستی و گیرنده، لازم است که ترانسفرازهایی نظیر گلیکوزیل ترانسفراز و نیز سولفو ترانسفراز قندی تغییراتی از نظر موقعیت فضایی و زمانی در هپارین سولفات پروتئوگلیکان‌ها ایجاد کنند (1). هم‌چنین این مولکول‌ها قادرند از دنا توراسیون حرارتی فاکتور رشد فیبروبلاستی، پروتئولیز و نیز جلوگیری از انتشار آنها به فضاهای میان بافتی محافظت کنند (67).

در سطح تنظیمی بعدی یعنی سطح گذرنده از غشاء پروتئین‌های تنظیمی زیادی تشخیص داده نشده‌اند. یک مثال از پروتئین گذرنده از غشاء Sef می‌باشد که با الگوی مشابه به FGF8 در موش بیان می‌شود. دو مکانیسم تنظیمی متفاوت برای این مولکول مطرح شده است که یکی این است که احتمالاً Sef از طریق برهم‌کنشی که با FRS2, FGFR1 و مسیر MAP کیناز و Akt می‌دهد قادر است مسیر پیام‌رسانی فاکتور رشد فیبروبلاستی را مهار کند و دیگر این که ممکن است روی مسیر پایین دست MEK اثر بگذارد. در واقع اثر مهار Sef روی فعالیت ترانسلوکاسیون هسته‌ای ERK، بدون مهار فعالیت سیتوپلاسمی آن می‌باشد (53).

مثال دیگر از پروتئین های تنظیمی در سطح تنظیمی گذرنده از غشاء XFLRT3 است که در زنوپوس شناسایی گردیده است. این پروتئین تنظیم گر مثبت مسیر پیام رسانی FGF می باشد. هم چنین مولکول های چسبندگی سلولی یا CAMs با ناحیه ی خارج سلولی خود مسیر پیام رسانی فاکتور رشد فیبروبلاستی را از طریق مسیر  $PLC\gamma/Ca^{2+}$  تنظیم می کنند. این فعل و انفعالات به خوبی در مورد سلول های عصبی مطالعه گردیده است (13).

سطح تنظیمی بعدی در سطوح داخل سلولی مسیر پیام رسانی فاکتور رشد فیبروبلاستی توسط دو گروه از پروتئین ها صورت می گیرد. در گروه اول PTP ها جای می گیرند که به طور کلی تنظیم کننده های مثبت و منفی پیام رسانی RTK می باشد. گروه دوم SPROUTY پروتئین ها می باشند که در دروزوفیلا شناسایی شده اند. بعدها چهار عضو دیگر از این خانواده در پستانداران شناسایی گردید. تمامی اعضای پروتئین های خانواده ی SPROUTY نواحی حفاظت شده ی غنی از سیستئین در انتهای C-ترمینال خود دارند که به ترانسلوکاسیون آنها به غشای پلاسمایی و عمل به عنوان یک تنظیم گر منفی کمک می کند. پروتئین های Sprouty در واقع به عنوان مولکول تنظیمی منفی در مسیر پیام رسانی فاکتور رشد فیبروبلاستی عمل می کند (3).

## ۲-۳ - ساختار عملکرد نارنجین

نارنجین (naringin) گلیکوزید فلاون می باشد فلاونوئید اصلی در گریپ فروت است و طعم تلخی به گریپ فروت می دهد و به طور طبیعی در مرکبات یافت می شود. نارنجین بازدارنده بعضی از داروهای آنزیم سیتوکروم p450 می باشد واز متابولیسم این دارو جلوگیری می کند که شامل CYP3A4, CYP1A2 میباشد که این ممکن است نتیجه برهمکنش میان دارو\_دارو باشد. خوردن نارنجین و یا فلاونوئیدهای مثل نارنجین می تواند باعث جذب روده ای برخی داروها شود که در *In Vitro* یا بررسی بر روی حیوانات مشاهده شده اما در سلامتی انسان هنوز ناشناخته است این اثرها شامل:

بازدارنده VEGF که سبب آنژیوژنز می شود. دیابت را کاهش داده و سبب نئوروپاتی در موش می شود و در ادراک اثر محافظتی و آسیب اکسیداتیو در موش نشان داده شده است.

نارنجین یکی از فلاونوئیدهایی است که مزه بسیار تلخی دارد. اثرات نارنجین در درمان سرطان سینه طی آزمایشات بالینی به اثبات رسیده است. در کشاورزی از نارنجین بعنوان محرک رشد برخی از سبزیجات مانند کلم چینی و تربچه استفاده میشود. طی بررسیهای بعمل آمده میزان فلاونوئیدهای موجود در مرکبات به شدت بستگی به زمان برداشت میوه های آن دارد (۷۵). اورتانو و همکاران (۱۹۹۷) اظهار داشتند که مقدار فلاونوئید نارنجین در میوه های نارس به مراتب بیشتر از مقدار آن در میوه های کاملاً رسیده است. آنها همچنین اظهار داشتند که اقلیم، نوع کولیتوار و پایه روی مقدار فلاونوئیدها تأثیر داشته و بیشترین میزان نارنجین در گریپ فروت روی پایه نارنج گزارش شده است. نارنجین اهمیت زیادی در صنایع مدرن داروسازی دارد.

علت تلخی لیمو شیرین نارنجین و لیمونین است که در مجاورت هوا اکسید میشوند. نارنجین دارای اثرات ضد تومور و ضد سرطان سینه میباشد. نارنجین سبب حفاظت معده در مقابل زخم های ایجاد شده میشود. به عنوان آنتی اکسیدان و کاهش دهنده چربی خون اهمیت فراوانی دارد. در آزمایشات بر روی حیوانات، نارنجین سبب افزایش کارایی جذب دارو ها برای فشار خون بالا میشود. در کشاورزی از نارنجین به عنوان محرک رشد برخی سبزیجات استفاده می گردد.

## ۲-۳-۱ - فلاونوئید و سرطان

در مطالعات انجام گرفته روی جوامع انسانی مشاهده شده است که اعتدال در مصرف فلاونوئیدها با کاهش میزان بروز سرطان پستان، پروستات و کولون نیز مرتبط است. همچنین در ایجاد بیماری های قلبی عروقی، سرطان و دیابت نقش مهمی را ایفا می کنند (50).

## ۲-۳-۲ مکانیسم مولکولی نارنجین در سرطان

سلول‌های سرطانی تحت تاثیر نارنجین از نظر بیولوژیکی دستخوش تغییر می‌شوند این تغییرات شامل تکثیر، تهاجم، متاستاز و آپوپتوز سلول‌های سرطانی می‌شود تعدادی از این مکانیسم‌ها تداخل با مسیر پیام‌رسانی سلولی را نشان می‌دهد

این ماده به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کرده و به سلول‌های بدن در محافظت از صدمات اکسیداتیو کمک می‌کند. دیده شده است که دارای ویژگی ضد سرطانی است بدون اینکه به سلول‌های بدن آسیب برساند. این ترکیب نوعی اسید زیستی می‌باشد و در برابر برخی سلول‌های سرطانی سیتوتوکسیک است بدون اینکه آسیبی به سلول‌های طبیعی وارد نماید.

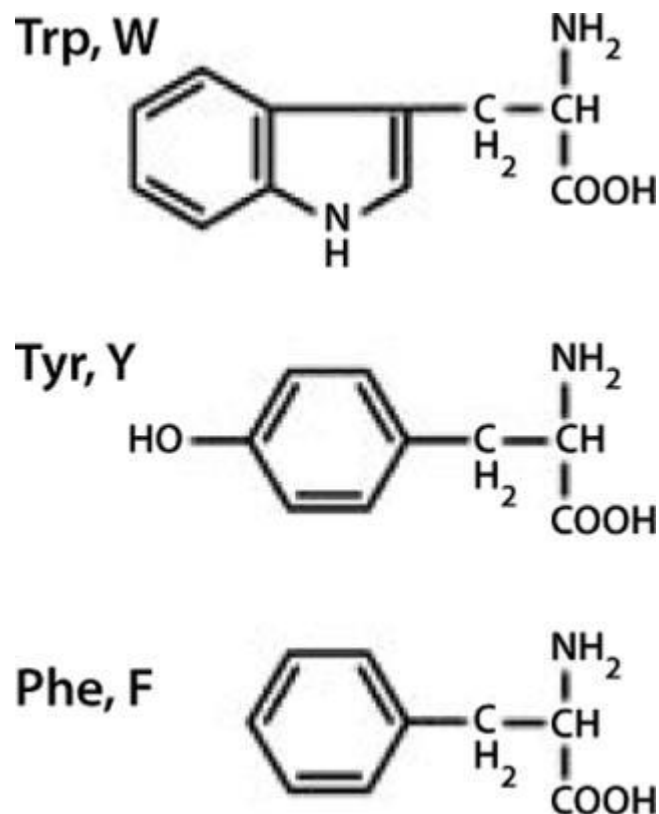
مهار مسیر سیگنالینگ و RAS/MPK شاید ناشی از کاهش تهاجم نارنجین باشد. نارنجین به عنوان اثر مهار کنندگی به کار برده می‌شود. توانایی ضد ویروسی نارنجین به فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط است. لیگاند‌های باند EFGF متعاقبا فعالیت مسیر ERK/MEK و AKT/PI3K که به تهاجم و دیگر فنوتیپ‌های بد خیم کمک می‌کند. نارنجین به طور قابل توجهی تنظیم فسفریلاسیون دو عضو PI3K/AKT و RAS/MAPK مسیرهای انتقال سیگنال را کاهش می‌دهد همچنین در تکثیر سلول، تهاجم و بقا نقش دارد.

Wasowski c, Pym LJ و همکارانش در سال ۲۰۱۲ بر روی فلاونوئید‌ها به عنوان لیگاند‌های گیرنده GABA آزمایش کردند و دریافتند به طور خلاصه فلاونوئید‌های طبیعی و سنتتیک به عنوان لیگاند جایگاه اتصال بنزودیازپین‌ها داروهای موثر روی گیرنده‌های GABA اثرات سودمند روی سیستم عصبی مرکزی دارند. در ضمن می‌توانند به عنوان ابزار برای مطالعه جایگاه‌های تنظیم کننده موجود در گیرنده‌های GABA و تولید داروهای GABA subtype-selective مورد استفاده قرار گیرند.



## ۲-۴ - مطالعه‌ی ساختاری پروتئین‌ها

اغلب پروتئین‌ها دارای توالی متشکل از ترکیب ۲۰ نوع ال-اسید آمینه‌ی که در طبیعت یافت می‌شوند هستند. در این بین تنها سه اسید آمینه‌ی ضروری تیروزین، تریپتوفان و فنیل آلانین شکل (۲-۹) قادر به جذب انرژی فرابنفش در طیف الکترومغناطیسی می‌باشند و تا حد زیادی خواص منحصر به فرد اسپکترال پروتئین‌ها به این سه اسید آمینه نسبت داده شده است. این سه اسید آمینه طول موج جذب و نشر متفاوتی دارند. تریپتوفان نسبت به تیروزین و فنیل آلانین خاصیت فلوئورسنس بیشتری دارد جدول (۲-۱). هرچند خواص فلوئورسنس تریپتوفان وابسته به محیط می‌باشد. به عنوان مثال زمانیکه قطبیت محلول کاهش پیدا می‌کند متعاقب آن طیف فلوئورسنس به سمت طول موج کوتاه‌تر شیفت می‌یابد و شدت نشر فلورسانس هم افزایش می‌یابد. این به این دلیل است که ریشه‌های تریپتوفان به بیشتر داخل نواحی هیدروفوبیک پروتئین می‌شود و موجب ایجاد یک شیفت در طیف نشری می‌گردند. این پدیده در مطالعات دنا توراسیون پروتئین‌ها استفاده می‌شود (80). بنابراین بر حسب تعداد این سه اسید آمینه (Y, W, F) و نیز محل قرار گیری آن‌ها در یک پروتئین، این سه اسید آمینه می‌توانند اطلاعاتی درباره‌ی ساختار پروتئین فراهم کنند. خواص اسپکترال این اسید آمینه‌ها به طور خالص در محلول بررسی شده است. از این خواص طیفی برای تعیین ویژگی‌های جذبی پروتئین‌ها در حالت طبیعی و فولد شده در مقایسه با حالت غیرطبیعی و دناتوره شده در حضور یک ماده دناتوره کننده برای مشخص شدن میزان پایداری استفاده شده است (۱۷).



شکل ۲-۷ - ساختار شیمیایی اسید آمینه های تیروزین (Y)، تریپتوفان (W) و فنیل آلانین (F).

جدول ۲-۱ - خصوصیات فلورسانس اسید آمینه های آروماتیک.

Amino Acid	Absorption		Fluorescence	
	Wavelength (nm)	Absorptivity	Wavelength (nm)	Quantum Yield
Tryptophan	280	5,600	348	0.20
Tyrosine	274	1,400	303	0.14
Phenylalanine	257	200	282	0.04

## ۲-۵- تکنیک‌های مطالعه ساختار پروتئین‌ها

### ۲-۵-۱- تاخوردگی (Folding) پروتئین

برای اینکه یک پروتئین بتواند به درستی عملکردهای بیولوژیکی خود را انجام دهد باید پایدار و به خوبی فولد شده باشد. گرچه اطلاعات بسیاری درمورد کنفورماسیون و نحوه ی سنتز بیولوژیکی پروتئین‌ها موجود است اما با این حال در مورد ساختار آنها و نیز نحوه ی فولدشدن پروتئین‌ها اطلاعات کمی وجود دارد. همچنین تعیین ویژگی‌های ساختاری پروتئینی که نیمه فولد شده یعنی زمانی که پروتئین در مرحله ی حدواسط در فرآیند فولدشدن پروتئین‌ها قرار دارد برای درک مکانیسم فولدینگ اهمیت حیاتی دارد. به این دلیل که ماهیت تعاونی فرآیند فولدینگ اجازه نمی دهد که پروتئین نیمه تاخورده در شرایط حد واسط بیشتر از چند دقیقه در شرایط تعادل و پایدار باقی بماند از این رو مطالعات کینتیکی برای تشخیص حد واسط ها نیاز است. با این حال نشان داده شده که تعدادی از پروتئین‌ها تحت شرایط دناتوراسیون قادرند پروتئین نیمه تاخورده ی مرحله ی حد واسط خود را به صورت پایدار نشان دهند. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد این حدواسط‌ها که اصطلاحاً کره ی مذاب نامیده می‌شوند در فرایندهای کینتیکی قابل تشخیص هستند. با این حال بازهم جزئیات مولکولی آنها را به سختی می‌توان به طور تجربی حتی در شرایط تعادل مشخص کرد. فقدان اطلاعات درمورد تشکیل حدواسط‌ها فرآیند تاخوردگی مجدد پروتئین‌های دناتوره شده را به حالتی که از نظر عملکرد بیولوژیکی طبیعی است بسیار پیچیده می‌کند. پیچیدگی این فرآیند در مورد مولتی دومین پروتئین بیشتر می‌باشد (25).

### ۲-۵-۲- مطالعه تاخوردگی (Folding) مولتی دومین پروتئین‌ها

آنالیز ژنوم گویای این مطلب است که بخش قابل توجهی از پروتئین‌ها بیش از یک دومین دارند. جزئی از پروتئین که دارای ساختار و عملکرد مجزا است و اغلب به صورت مجزا بیان می‌شود دومین نامیده می‌شود. برای مثال لایوزیم با اینکه دو دومین ساختاری دارد اما به عنوان یک پروتئین تک دومین

شناخته می‌شود به این دلیل که هیچ یک از دومن‌ها به تنهایی پایدار نیستند. علاوه بر این، این تعریف شامل پروتئین‌های ساخته شده از واحدهای تکراری کوچک که به تنهایی نمی‌توانند بیان شوند نمی‌شود. حدود ۴۰ تا ۶۵ درصد پروکاریوت‌ها حاوی پروتئین‌های چند دومنی می‌باشند که این درصد در یوکاریوت‌ها بیشتر و بین ۶۵ تا ۸۰ درصد می‌باشد. در یک پروتئین مولتی دومن، دومن‌ها با یک اتصال دهنده‌ی کوتاه و ساختاری و یا یک اتصال دهنده‌ی بلند و انعطاف پذیر به هم مرتبط می‌شوند هم چنین خود این اتصال دهنده‌ها ممکن است در عملکرد پروتئین دارای نقش مهمی باشند. به طور کلی پیچیدگی فرآیند آنفولدینگ در پروتئین‌هایی که بیش از یک دومن دارند دیده می‌شود. این پیچیدگی به این دلیلی است که هر دومن می‌تواند به طور مستقل از دومن دیگر آنفولد شود. برای مطالعه‌ی دنا تورا سیون و فولدینگ مولتی دومن پروتئین‌ها تکنیک‌های متفاوتی وجود دارد. طیف سنجی فلورسانس یک ابزار قابل اعتماد در مطالعه‌ی پروتئین‌هاست. این روش حساسیت و انتخاب پذیری بالایی دارد. تکنیک‌های دیگر شامل دورنگ نمایی حلقوی و روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS) و غیره می‌باشند (6)

## ۲-۶- کینیک فلورسانس اسپکتروسکوپی

برای اولین بار فلورسانس در اواسط قرن ۱۹ توسط سر جان فردریک ویلیام هرشل مطرح شد. فلورسانس در واقع شکل ویژه‌ای از لومینسانس است مشخصه‌ی آن آزاد شدن یک فوتون از مولکولی است که در حین انتقال از حالت برانگیخته به حالت پایه می‌رسد. این آزاد شدن انرژی با سرعتی معادل با  $10^8 \text{ s}^{-1}$  رخ می‌دهد. انواع فرایندهای فعال و غیرفعال سازی فلورسانس در شکل (۲-۱۰) که دیاگرام جابلونسکی (Jablonski Diagram) گفته می‌شود، نشان داده شده است (این دیاگرام حالت‌های الکترونی مولکول، زیر حالت‌های ارتعاشی و انتقالات بین این حالت‌ها را نشان می‌دهد).

مراحل اصلی ذکر شده در نمودار به تفصیل در زیر آمده است:

مرحله ی جذب (Absorption): جذب با تحریک بسیار سریع اتفاق می افتد ( $10^{-15}$  ثانیه) انتقالات جذبی از حالت پایه ارتعاشی در تراز الکترونی یکتایی پایه ( $S_0$ ) به ترازهای مختلف ارتعاشی در اولین و دومین حالت الکترونی برانگیخته ( $S_1$  و  $S_2$ ) در شکل نشان داده شده است.

## ۲-۶-۱- مرحله آسایش ارتعاشی (Vibrational Relaxation)

این فرایند نوعی آسایش غیرتابشی است. ملکول های موجود در حالت های ارتعاشی برانگیخته به سرعت انرژی اضافی ارتعاشی خود را از دست داده و به سطح ارتعاشی پایه در تراز الکترونی مربوطه می روند. انرژی در این حالت به صورت گرمایی یا حرکات ارتعاشی مولکول های حلال از دست می رود. به طور طبیعی آسایش ارتعاشی به صورت گام به گام اتفاق می افتد و شرط انتقال از تراز ابتدایی ( $v_i$ ) به تراز نهایی ( $v_f$ ) رابطه  $\Delta v=1$  می باشد. این بدان مفهوم است که برآثر هر برخورد ملکول با ملکول های حلال، که منجر به غیرفعالسازی غیرتابشی می شود، مولکول برانگیخته یک کوانتوم از انرژی ارتعاشی خود را از دست داده و صرفاً انتقال به یک تراز انرژی پایین تر در مرحله رخ می دهد. مدت زمان انجام این فرایند  $10^{-10}$  تا  $10^{-11}$  ثانیه می باشد.

## ۲-۶-۲- مرحله تبدیل درونی (Internal Conversion)

انتقال الکترون بین دو تراز الکترونی با چندگانگی اسپین یکسان است، که به شیوه غیرتابشی صورت می گیرد. شرط انجام این فرایند همپوشانی نمودارهای انرژی پتانسیل دو تراز الکترونی است به نحوی که انرژی حالت ارتعاشی پایین تر تراز الکترونی بالاتر و حالت ارتعاشی بالاتر تراز الکترونی پایین تر با هم برابر باشد. این فرایند می تواند بین دو حالت برانگیخته رخ دهد ( $S_2 \rightarrow S_1$ ) و یا بین اولین حالت الکترونی برانگیخته و حالت الکترونی پایه ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) اتفاق بیفتد. مدت زمان انجام این فرایند بین حالت های الکترونی برانگیخته،  $10^{-12}$  ثانیه است. تبدیل درونی از یک حالت برانگیخته الکترونی به حالت الکترونی پایه ( $S \rightarrow S_0$ ) وابسته به نوع ملکول بوده ولی معمولاً در صورتی که تفاوت انرژی زیادی بین  $S_0$  و  $S$  وجود داشته باشد، کارایی کمتری دارد. بنابراین هیچ گونه هم پوشانی بین چاه های انرژی

پتانسیل دو حالت وجود نخواهد داشت. بعد از تبدیل درونی، انرژی اضافی به سرعت از دست رفته و مولکول در پایین ترین سطح ارتعاشی حالت الکترونی پایین تر قرار می گیرد.

## ۲-۶-۳ - مرحله فلورسانس

انتقال تابشی بین حالت‌های الکترونی با چندگانگی اسپین یکسان است. در مورد بیشتر مولکول‌ها، الکترون‌ها در حالت پایه جفت می شوند (با اسپین‌های مخالف) بنابراین فلورسانس شامل یک انتقال یکتایی-یکتایی است. با توجه به این که تبدیل درونی به تراز  $S$  و آسایش ارتعاشی بعد از آن بسیار سریعتر از فلورسانس است، فلورسانس معمولاً از پایین‌ترین تراز ارتعاشی  $S$  به حالت‌های ارتعاشی مختلف در تراز الکترونی پایه صورت می‌گیرد. بنابراین حتی اگر جذب به حالت‌های مختلف یکتایی برانگیخته صورت گرفته باشد تنها یک باند فلورسانس دیده می‌شود. به طور معمول مدت زمان فلورسانس  $10^{-6}$  ثانیه است. باندهای فلورسانس مولکولی عمدتاً از خطوطی تشکیل شده که طول موج بلندتر یا فرکانس کمتری (انرژی کمتر) نسبت به باند جذبی خود دارند. شیفت به طول موج‌های بلندتر، شیفت استوک (Stokes Shift) نیز خوانده می‌شود.

## ۲-۶-۴ - مرحله تبدیل بیرونی (External Conversion)

نوعی آسایش غیرتابشی است که در آن حالت‌های برانگیخته انرژی اضافی خود را به سایر گونه‌ها (مثل حلال یا مولکول‌های حل شونده) می‌دهند. یکی از مکانیزم‌های تبدیل بیرونی، خاموشی برخوردی یا دینامیک است. در این نوع خاموشی، طی برخورد انرژی از گونه برانگیخته به سایر مولکول‌ها منتقل می‌شود. بنابراین سرعت خاموشی دینامیک با سرد کردن نمونه کاهش می‌یابد.

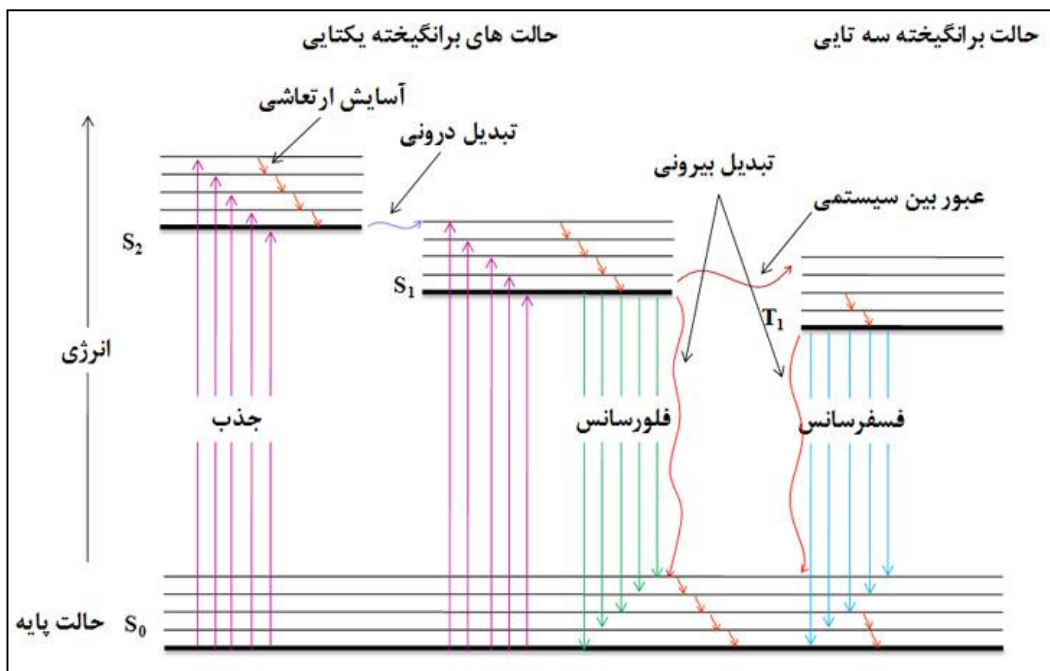
## ۲-۶-۵ - مرحله عبور سیستمی (Intersystem Crossing)

انتقالات جذبی از حالت‌های یک تایی به سه تایی ممنوع است. هر چند جذب ضعیفی در مورد برخی مولکول‌ها امکان پذیر است. تراز برانگیخته سه تایی همچنین می‌تواند از طریق انتقال الکترون از ترازهای یکتایی برانگیخته پر شود. به این فرایند، عبور بین سیستمی گفته می‌شود. این فرایند مشابه تبدیل

درونی است، با این تفاوت که انتقال الکترون بین ترازهایی که چندگانگی متفاوت دارند انجام می‌شود. بعد از عبور بین سیستمی، مولکول با آسایش ارتعاشی به پایین ترین حالت ارتعاشی در تراز الکترونی که در آن قرار دارد می‌رود.

## ۲-۶-۶- مرحله فسفرسانس

به طور معمول ترازهای سه تایی که از الکترون پر شده‌اند به وسیله تبدیل بیرونی و یا عبور بین سیستمی به تراز الکترونی پایه غیرفعال می‌شوند. ( $T_1 \rightarrow S_0$ ) ترازهای سه تایی می‌توانند به وسیله نشر یک فوتون نیز غیر فعال می‌شود. غیر فعال سازی تابشی بین حالت‌های الکترونی با چندگانگی متفاوت فسفرسانس خوانده می‌شود. معمولاً مدت زمان انجام فسفرسانس  $10^{-4}$  ثانیه می‌باشد. بیشتر بودن طول عمر فسفرسانس به دلیل غیرمجاز بودن آن به لحاظ اسپینی است (تغییر چندگانگی اسپین در خلال انتقالات از دیدگاه کوانتومی غیر مجاز است). بنابراین تنها زمانی که احتمال وقوع تبدیل بیرونی با سرد کردن نمونه کاهش یابد فسفرسانس رخ می‌دهد. طول موج فسفرسانس یک ترکیب مشخص معمولاً بلندتر از طول موج فلورسانس است، به این دلیل که انرژی  $T_1$  از انرژی  $S_1$  کمتر است (11).



شکل ۲-۱- دیاگرام جابلونسکی.

حالت های الکترونی مولکول، زیر حالت های ارتعاشی و انتقالات بین این حالت ها

## ۲-۷- تکنیک ها و عوامل دنا تورا سیون

### ۲-۷-۱- دنا تورا سیون

دنا تورا سیون پروتئینی یک فرآیند برگشت پذیر و یا غیر قابل برگشت می تواند باشد. دنا تورا سیون در واقع به تغییری که در کنفورماسیون پروتئین ایجاد شود و منجر به آنفولد شدن کل ساختار پروتئین شود اطلاق می شود. علاوه بر این، چنین تغییراتی بدون شکستن پیوندهای پپتیدی رخ می دهد. در این شرایط پروتئین بدلیل از دست دادن ساختار سوم خود فعالیت بیولوژیکی ندارد. از طرفی دنا تورا سیون منجر به در معرض قرار گرفتن گروه های هیدروفوبیکی می شود که این امر تمایل جذب سطحی نقاط هیدروفوبیکی پروتئین ها را به یکدیگر و تشکیل و تجمع رسوب پروتئینی افزایش می دهد (24).



## ۲-۷-۲ مطالعه پایداری پروتئین‌ها

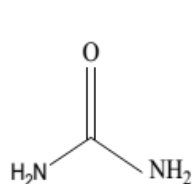
در تحقیقات بیومولکولی نظیر مهندسی پروتئین، شیمی پروتئین، کشف و طراحی داروها، تعیین فاکتورهای موثر در پایداری پروتئین‌ها اهمیت بالقوه‌ای دارد. در این تحقیقات از روی پارامترهایی نظیر تغییرات انرژی آزاد گیبس ( $\Delta G^\circ$ ) و نیز ویژگی‌هایی که یک پروتئین در حین عبور از حالت طبیعی و فولدشده به حالت غیرطبیعی و آنفولد شده در حین دناتوراسیون پیدا می‌کند می‌توان پایداری ترمودینامیکی را مشخص کرد.

در بین پارامترهایی که پایداری یک پروتئین را تعیین می‌کنند، می‌توان به موارد زیر اشاره نمود از جمله به پیوندهای هیدروژنی، تعاملات هیدروفوبیک، پیوندهای واندروالسی، پل‌های نمکی و تعاملات آروماتیکی که همگی بستگی به نوع ترکیب آمینواسیدهای یک پروتئین دارند و نیز تغییرات پس از ترجمه نظیر گلیکوزیله شدن و متیله شدن که روی پروتئین ایجاد می‌شوند هم چنین یکسری فاکتورهای محیطی نظیر دما، فشار، نمک‌ها، pH و غیره هستند که روی پایداری یک پروتئین تاثیر می‌گذارند. به عنوان مثال اضافه نمودن یک ماده‌ی شیمیایی نظیر گوانیدین هیدروکلراید و یا اوره منجر به دناتوره شدن پروتئین و متعاقب آن تغییر در پایداری پروتئین می‌شود (40,77).

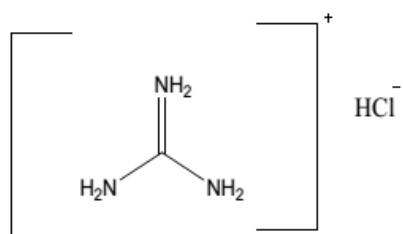
## ۲-۷-۳ روش دناتوراسیون شیمیایی

اوره و گوانیدین هیدروکلراید ترکیباتی هستند که به طور معمول جهت دناتوراسیون شیمیایی به کار گرفته می‌شوند شکل (۲-۱۱). این ترکیبات با تخریب پیوندهای هیدروژنی منجر به آنفولد شدن پروتئین‌ها می‌شوند. در غلظت‌های بالا از این دناتوره‌کننده‌ها به عنوان مثال غلظت ۸ مولار برای اوره و غلظت ۴ مولار برای گوانیدین هیدروکلراید پروتئین‌ها تمایل به آنفولد شدن دارند. در حقیقت دناتوراسیون شیمیایی منجر به از دست رفتن پایداری در پروتئین می‌شود. در حین دناتوراسیون شیمیایی ساختار اولیه پروتئین دست نخورده باقی می‌ماند. اما ساختارهای دوم و سوم پروتئین دستخوش تغییر می‌شوند. در این حالت پروتئین از حالت فولد شده به یکی از دو حالت نسبتاً فولد شده

و کاملاً آنفولد شده می‌رسد. همچنین وجود مرحله‌ی حد واسط هم در این واکنش از طریق مطالعات دناتوراسیون شیمیایی قابل بررسی می‌باشد. فرآیند آنفولدینگ بعضی پروتئین‌ها در حضور گوانیدین هیدروکلراید سه حالت گذار را نشان می‌دهد. شامل مرحله ی (N) NATIVE، حد واسط (I) و مرحله‌ی آنفولد شده (U). وجود مرحله‌ی حدواسط در حین دناتوراسیون نشان دهنده‌ی پروتئین در حالت کره‌ی مذاب می‌باشد که دارای ساختار ثانویه‌ای مشابه با حالت NATIVE است که این امر توسط تکنیک دورنگ نمایی حلقوی با تعیین درصد محتوای آلفا هلیکس، صفحه‌های بتا و راندوم کویل‌ها تایید شده است (10).



UREA



GUANIDINE HYDROCHLORIDE

**شکل ۲-۹ - ساختار شیمیایی اوره و گوانیدین هیدروکلراید.**

ترکیباتی که به طور معمول جهت دناتوراسیون شیمیایی به کار گرفته می‌شوند.

## ۲-۸ - تکنیک‌های تولید و تلخیص پروتئین‌های نو ترکیب

### ۲-۸-۱ - کاربرد پروتئین‌های نو ترکیب

پروتئین‌ها در بدن دارای نقش بسیار مهم و گسترده‌ای در فرآیندهای بیولوژیک، انتقال مواد به درون سلول‌ها و بیرون از آن، تشکیل گیرنده‌های سلولی، تسریع واکنش‌های بیوشیمیایی و فرآیند پیام‌رسانی بر عهده دارند. تاکنون ۲۵۰۰۰ الی ۴۰۰۰۰ ژن در بدن انسان تخمین زده شده است و با برآورد نقش

ژن ها و تعداد زیادی از پروتئین های حیاتی که خود بر مبنای تغییرات ساختمانی مولکول های بسیار زیادی را تولید می کنند می توان به تعدد بیشتر آنها در بدن پی برد.

## ۲-۸-۲ پروتئین های نو ترکیب (Recombinant Protein)

روش های تولید پروتئین های نو ترکیب به عنوان روش های مورد نیاز و اساسی در علم بیوتکنولوژی امکان تولید بسیاری از مولکول های حیاتی مانند داروها، انسولین و پروتئین های خون، هورمونها مثل هورمون- های رشد و واکسن ها و غیره را فراهم می نماید. برای تولید پروتئین های نو ترکیب از تکنیک های کلونینگ مولکولی استفاده می شود که در آن ژن مورد نظر توسط حامل هایی به نام وکتور درون باکتری های مخصوصی وارد شده تا به عنوان جزئی از ژن باکتری و به همراه آن تکثیر شده و پروتئین مورد نظر همراه با سایر پروتئین های باکتری بیان شود. سپس با روش های مختلف کروماتوگرافی ستونی پروتئین- ها خالص سازی شده و خصوصیات آن از لحاظ فعالیت بیولوژیکی و ساختمانی با روش هایی مانند روش ELISA مورد بررسی قرار می گیرد. پس از طی مراحل ذکر شده پروتئین مذکور به عنوان دارو، مکمل یا در زمینه های تحقیقاتی مورد استفاده قرار می گیرد

محصولات نو ترکیب که با دستکاری های ژنتیکی و تغییرات DNA در موجودات مختلف همراه است موجب تحول عظیمی در نوع و تنوع فرآورده های دارویی مورد مصرف شده است به طوری که امروزه شاهد مصرف فرآورده های نو ترکیب دارویی با وزن مولکولی بالا به جای مولکول های شیمیایی کوچک دیروز هستیم. داروهای پروتئینی دارای عملکرد بسیار اختصاصی هستند. لذا بر روی سایر فرآورده های بیولوژیک غیر مرتبط اثر سوئی نخواهند گذاشت و از این نظر کمتر دارای عوارض جانبی هستند.

دو مزیت که برای پروتئین های درمانگر وجود دارد سبب شده تا دور نمای اقتصادی بسیار جالبی برای آنها نسبت به داروهای متداول ترسیم شود. اکثر داروهای پروتئینی حاصل فناوری DNA نو ترکیب است مگر برخی از موارد کم مانند آنزیم های پانکراس و یا مهار کننده های آلفا-یک پروتئاز که از

استخراج بافت های حیوانی و پلاسمای انسانی بدست می آید. سیستم های بیولوژیکی که از آن ها پروتئین های نو ترکیب بدست می آیند عبارت از انواع باکتری ها، مخمرها، سلول های جانوری و حشرات و گیاهی و سلول های حاصل از حیوانات دستکاری شده ژنتیکی می باشد. مرحله دیگری که از این پروتئین ها میتوان فرآورده های اصلاح شده بدست آورد عبارت است از بهینه کردن آنها بر مبنای گلیکوزیله کردن، فسفریلاسیون و تجزیه پروتئولیتیک. بطور مثال باکتری ها نمی توانند واکنش های گلیکوزیله شدن انجام دهند. لذا بر مبنای هر یک از تغییرات فوق میتوان پروتئین اصلاح شده ای را با مزایای بیشتری بدست آورد .

مولکول انسولین اولین دارویی بود که بر مبنای آن تمایل به تغییرات و بهینه سازی آن ایجاد شد. سابق بر این انسولین حاصل استخراج و خالص سازی از پانکراس بود و این نوع فرآورده ها حداقل سه عدم مزیت را با خود داشت. اول آنکه محدودیت حیوانی برای استخراج برای آنها وجود دارد و دوم اینکه هزینه این نوع استخراج از حیوان زیاد و نیازمند صرف وقت بوده و اینکه در برخی مواقع نسبت به این نوع فرآورده ها آلرژی همراه با پاسخ عدم تحمل پذیری وجود دارد .

این محدودیت ها باعث شد تا تحقیقات بر مبنای جدا سازی ژن تولید کننده انسولین انسانی حاصل صورت گیرد و سپس ژن مدنظر را در E.Coli با مهندسی ژنتیک وارد شود که سبب تولید انسولین انسانی از طریق فناوری DNA نو ترکیب گردید. در نهایت این فناوری موجب شد تا انسولین انسانی با مزایای کم هزینه تر و در دسترس تر و با حالت خطر کمتر و با ایمنی زایی همراه به طور صنعتی تهیه شود

پروتئین های نو ترکیب نسبت به سایر پروتئین ها دارای مزیت هایی هستند. یکی از این مزیت ها آن است که نسخه کپی شده و باز نویسی شده از ژن انسانی می تواند همانند دقیقی از ترکیب طبیعی بدن باشد و بطور اختصاصی عمل نماید و نسبت به آن نیز واکنش ایمنی کمتری در بدن داشته باشد. ثانیاً پروتئین های نو ترکیب بطور موثرتر و با هزینه کمتری و با فراوانی بیشتری تولید میشوند. یکی از موارد

کاربرد فرآورده‌های نو ترکیب در درمان بیماری گوشه Gaucher's disease است. این عارضه ژنتیکی و نقص متابولیکی لیپیدی در اثر کمبود آنزیم بتا گلوکوروسربروزیداز بوجود می‌آید و سبب بزرگ تر شدن کبد و طحال می‌گردد و در پوست بدن نیز زخم‌هایی همراه رنگ دانه‌هایی ایجاد می‌شود. این آنزیم در ابتدا از جفت انسانی استخراج و حاصل می‌شد. برای درمان یک بیمار در سال نیاز بود تا این آنزیم از ۵۰۰۰۰ جفت انسانی استخراج و خالص سازی شود که از نظر عملی کار بسیار زیادی لازم بود. آنزیم بتا گلوکوروسربروزیداز بصورت نو ترکیب تهیه شد و این آنزیم با این فناوری نه تنها به حد کافی تولید می‌شود بلکه خطر انتقال عوامل ویروسی نیز از بین رفت

## ۹-۲- تولید پروتئین‌های نو ترکیب در گیاهان

از آنجایی که یک ژن می‌تواند در سیستم‌های گوناگونی بیان گردد، بنابراین تعیین سیستمی با بیشترین بازده تولید پروتئین‌های نو ترکیب امری ضروری در نظر گرفته می‌شود. تعیین بهترین سیستم بیان کننده پروتئین‌های نو ترکیب یکی از مباحث مهم در بیوتکنولوژی است. یک سیستم بیان کننده پروتئین‌های نو ترکیب باید بتواند مواد زیستی را با بیشترین فعالیت بیولوژیکی و ایمنی و کمترین هزینه تولید کند. در حال حاضر بعضی از شرکت‌های معروف برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب از سیستم‌های فرمانتاسیون باکتری‌ها (مانند: *E.coli*) یا سلول پستانداران استفاده می‌کنند. اما این سیستم‌ها دارای محدودیت‌هایی هستند. سیستم‌های بیانی که جهت تولید پروتئین‌های نو ترکیب از سلول‌های پستانداران استفاده می‌کنند، فرآورده‌های را به وجود می‌آورند که کاملاً مشابه آنهایی است که بطور طبیعی در بدن انسان سنتز می‌شوند.

اما چون کشت این سلول‌ها گران تمام می‌شود، این سیستم در مقیاس محدود قابل اجرا است. کاربرد میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها باعث می‌گردد که پروتئین‌های نو ترکیب در مقیاس وسیع تولید شوند؛ اما مهمترین مشکل این سیستم‌ها این است که فرآورده‌های حاصل به طور محسوسی با فرآورده‌های طبیعی انسانی اختلاف دارند. برای مثال، پروتئین‌های که معمولاً در انسان گلیکوزیله می‌شوند، به وسیله

باکتری‌ها گلیکوزیله نمی‌گردند. زیرا باکتری‌ها فاقد امکانات سلول‌های یوکاریوتی جهت انجام اصلاحات پس از ترجمه هستند. پردازش پس از ترجمه برای فعالیت زیستی تعداد زیادی از پروتئین‌های انسانی از جمله آنتی‌بادی‌ها لازم است. گیاهان واریخته جایگزین مناسبی برای سیستم‌های رایج بیان کننده پروتئین‌های نو ترکیب همچون کشت سلول‌های جانوری و پروکاریوتی هستند. گیاهان واریخته دارای ژن یا ژن‌هایی هستند که بطور مصنوعی به آن‌ها الحاق شده است. آزمایش‌های پزشکی نشان می‌دهند که پروتئین‌های تولید شده در گیاهان از نظر فعالیت‌های زیست شناختی و ساختمانی با پروتئین‌های مشابه که از سیستم‌های کشت سلول‌های انسانی و حیوانی بدست آمده‌اند، قابل مقایسه هستند.

## ۲-۹-۱- استفاده از E. coli به عنوان یک ارگانیسم میزبان برای تولید پروتئین

رایج‌ترین ارگانیسم مورد استفاده برای بیان پروتئین‌ها باکتری E.coli است. تمام مواردی که موجب افزایش بیان پروتئین در E.coli می‌شوند در سیستم‌های بیانی دیگر نیز بکار گرفته می‌شوند. عواملی نظیر سرعت رشد بالا، آسانی کار با این میکروارگانیسم، رشد در محیط کشت نسبتاً غنی و بی‌ضرر بودن برای انسان و یا محیط زیست کار با این میکروارگانیسم را آسان می‌کند.

## ۲-۹-۲- خالص‌سازی پروتئین‌های نو ترکیب

زمانی که میزان بالایی از پروتئین داخل سلول تولید شد برای اینکه بتوان جزئیات پروتئین بیان شده را مورد مطالعه قرار داد نیاز است که خالص‌سازی پروتئین در سطح مطلوبی صورت بگیرد. این بدان معنی است که می‌بایست پروتئین‌های مورد نظر ما از سایر اجزای سلول از جمله تمام پروتئین‌های دیگر جدا شود تخلیص پروتئین یک فرآیند پیچیده می‌باشد و نیاز به درجه بالایی از مهارت و تجربه دارد. هم‌چنین پروتکل‌های تخلیص پروتئین اغلب با تلاش بی‌وقفه بدست آمده و تست شده‌اند. اکثر پروتکل‌های تکیه بر پیدا کردن ویژگی خاصی از پروتئین‌ها دارند که می‌تواند به تدریج پروتئین مورد نظر را از تمام پروتئین‌ها و اجزای دیگر سلولی تفکیک کند. استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی یک روش تخلیص پروتئین است. این روش به طور گسترده برای طیف وسیعی از پروتئین‌هایی

با خواص متفاوت قابل اجرا است. در کروماتوگرافی میل ترکیبی، اضافه نمودن اسیدهای آمینه های خاص به پروتئین یک ویژگی جدید می دهد که موجب اتصال محکم آن به یک ماده خاص می گردد. یک مثال رایج استفاده از "His tag" برای کمک به تخلیص کردن یک پروتئین است. این تگ یک رشته (معمولا شش تا) از رزیدوهای هیستیدین است که به پایانه N و یا پایانه C پروتئین ها اضافه می گردد. همچنین در حال حاضر پلاسمیدهایی به صورت تجاری در دسترس هستند که حاوی کدون خود تگ می باشند. حضور این آمینواسیدهای اضافی در پروتئین اغلب هیچ گونه تداخلی با عملکرد طبیعی پروتئین ندارد و موجب اتصال محکم پروتئین به یونهای فلزی مانند نیکل می شود. به صورت تجاری رزین های که به یون فلزی نیکل اتصال دارند جهت تخلیص پروتئین های دارای تگ هیستیدین مورد استفاده قرار می گیرند. در روش کروماتوگرافی میل ترکیبی سلول های E.coli از ستون حاوی رزین های نیکل عبور داده می شود و پروتئین های دارای تگ هیستیدین به یون نیکل متصل می گردند. سپس برای آزاد شدن این اتصال از بافر ایمیدازول استفاده می گردد.

## فصل سوم: مواد و روش ها



### ۳-۱- مواد، تجهیزات و متغیرهای آزمایشی

در این تحقیق پروتئین FGFR2b بیان و تخلیص شد و نارنجین از شرکت سیگما، تهیه شدند. بقیه مواد شیمیایی مورد استفاده از نوع خالص بودند. غلظت پروتئین مورد نظر که شامل ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نو ترکیب FGFR2b بود توسط دستگاه نانودراپ با استفاده از ضریب خاموشی  $M^{-}$   $41160\text{ cm}^{-1}$  در طول موج ۲۸۰ نانومتر به دست آمد که بر اساس توالی اسید آمینه محاسبه شده بود.

#### ۳-۱-۱- مواد مورد استفاده در آزمایش

۱. محیط کشت LB Broth جهت کشت باکتری در حجم بالا
۲. محیط کشت LB Agar جهت تهیه کلونی از باکتری کشت داده شده
۳. سلول‌های مستعد (پذیرا) BL21(DE3) جهت ترانسفورماسیون
۴. پلاسمید pLEICS-01 که حاوی ژن ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نو ترکیب FGFR2b
۵. پروتئین فسفولیپاز C جهت بررسی عملکرد ناحیه کینازی پروتئین
۶. آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین جهت انتخاب کلونی‌های حاوی پلاسمید
۷. اسیدکلریدریک ۱ مولار جهت تنظیم PH بافرها
۸. هیدروکسید سدیم ۱ مولار جهت تنظیم PH بافرها
۹. ایزوپروپیل بتا-دی-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید IPTG جهت القاء بیان ژن
۱۰. NaCl جهت تهیه بافر دیالیز، بافر لیزکننده سلولی و بافرهای تخلیص پروتئین
۱۱. Tris base و Tris-Hcl جهت تهیه بافرهای پلی آکریلامی ژل الکتروفورزیس
۱۲. الکل ۲۰٪ جهت نگهداری ستون نیکل و غشای دیالیز
۱۳. الکل ۷۰٪ جهت استریل کردن
۱۴. گلیسین جهت تهیه بافر ژل الکتروفورزیس

۱۵. آکريل آميد و بيس آکريل آميد جهت تهيه ي پلي آکريل آميد ژل الکتروفورز
۱۶. TEMED و آمونیوم پرسولفات (APS) جهت تهيه پلي آکريل آميد ژل الکتروفورز
۱۷. گليسرول جهت تهيه سمپل بافر، استوک باکتری کشت داده شده و بافر ليز کننده سلولي
۱۸. بروموفنول بلو و مرکاپتواتانول جهت تهيه سمپل بافر
۱۹. متانول، کماسی بلو و اسيد استیک جهت تهيه بافر Staining
۲۰. ايميدازول و Hepes جهت تهيه بافر تخليص پروتئين
۲۱. محلول نیکل جهت تخليص پروتئين
۲۲. گوانيدین هيدروکلراید (GdnHCl) جهت مطالعات دناتوراسيون شيميايي
۲۳. مارکر پروتئين جهت بررسی وزن مولکولي پروتئين
۲۴. نارينجين جهت برهم کنش با پروتئين مورد نظر
۲۵. DMSO جهت حل کردن نارنجين
- ۳-۱-۲- دستگاه‌ها و تجهيزات مورد استفاده در آزمایش
۱. اسپکتروفوتومتري مرئی (Visible spectrophotometry)
۲. اسپکتروفلوريمتری Cary مدل Bio700 (Spectrofluorimetry)
۳. انکوباتور معمولی ۳۷ درجه سانتیگراد (Incubator)
۴. انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتیگراد (Incubator shaker)
۵. انکوباتور شیکر یخچال دار (Refrigerated shaker)
۶. سانتریفیوژ معمولی (Centrifuge)
۷. فریزر تا ۸۰- درجه سانتیگراد (Ultra-low temperature lab freezers)
۸. فریزر تا ۲۰- درجه سانتیگراد (Ultra-low temperature lab freezers)
۹. یخچال معمولی ۴ درجه سانتیگراد (Refrigerator)
۱۰. دستگاه اتوکلاو (autoclave)

۱۱. ورتکس (vortex)
۱۲. دستگاه PH سنج (PH meter)
۱۳. ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم (1mg Digital scale)
۱۴. ترازوی دیجیتالی با دقت ۱ گرم (1g Digital scale)
۱۵. دستگاه پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (Electrophoresis equipment)
۱۶. دستگاه سونیکاتور (Sonication bacterial lysis)
۱۷. دستگاه نانو دراپ (Nanodrop)
۱۸. ستون تخلیص کروماتوگرافی (Column chromatography)
۱۹. غشای دیالیز (Dialysis membrane)
۲۰. بن ماری ۳۷ تا ۴۲ درجه سانتیگراد (37 degree water bath)
۲۱. سمپلرهای ۱۰، ۱۰۰، و ۱۰۰۰ میکرولیتر (Sampler)
۲۲. میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتر (Microtube)
۲۳. لوله فالکن ۱۵ و ۵۰ میلی لیتر (Falcon)
۲۴. دستگاه یخ ساز (Ice maker)

### ۳-۲- محلول ها و بافرها

#### ۳-۲-۱- تهیه استوک آمپی سیلین

۱۰۰ میلی گرم آمپی سیلین را در ۱ میلی لیتر آب مقطر استریل حل کرده تا غلظت نهایی آن به ۱۰۰ mg/ml برسد. پس از تهیه آن را به حجم های کوچکتر تقسیم کرده و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری کردیم.

### ۳-۲-۲- تهیه استوک IPTG

۰/۰۵۹۵ میلی گرم IPTG را در ۱ میلی لیتر آب مقطر استریل حل کرده تا غلظت نهایی آن به mM ۲۵۰ برسد. پس از تهیه آن را به حجم های کوچکتر تقسیم کرده و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری کردیم.

### ۳-۲-۳- تهیه بافر لیزکننده سلول جهت بررسی حلالیت پروتئین

۱/۹۶ گرم Tris-Hcl و ۲/۹۲ گرم NaCl را وزن کرده و در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کردیم تا غلظت نهایی هرکدام در محلول به ترتیب ۲۵ و ۱۰۰ میلی مولار باشد (PH۸).

### ۳-۲-۴- تهیه بافر لیزکننده سلول جهت تلخیص پروتئین

این محلول حاوی ۱۰٪ گلیسرول، ۲/۹۷ گرم HEPES و ۲/۹۲ گرم NaCl می باشد که در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه گردید غلظت نهایی HEPES و NaCl در این محلول به ترتیب ۲۵ و ۱۰۰ میلی مولار بود (PH 8).

### ۳-۲-۵- تهیه محلول ژل پلی آکریل آمید ۴٪

۶/۱ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه، ۱/۳ میلی لیتر از محلول آکریل آمید- بیس آکریل آمید ۳۰٪ ، ۲/۵ میلی لیتر از ژل بافر Tris-Hcl ۰/۵ مولار و ۰/۱ میلی لیتر از محلول SDS ۱۰٪ را ترکیب نموده و با اضافه نمودن ۵۰ میکرولیتر APS ۱۰٪ و ۱۰ میکرولیتر TEMED به محلول آن را به عنوان ژل Stacking استفاده کردیم.

### ۳-۲-۶- تهیه محلول ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪

۳/۴ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه، ۴ میلی لیتر از محلول آکریل آمید- بیس آکریل آمید ۳۰٪ ، ۲/۵ میلی لیتر از ژل بافر Tris-Hcl ۱/۵ مولار و ۰/۱ میلی لیتر از محلول SDS ۱۰٪ را ترکیب نموده و با اضافه نمودن ۵۰ میکرولیتر APS ۱۰٪ و ۵ میکرولیتر TEMED به محلول آن را به عنوان ژل Resolving استفاده کردیم.

### ۷-۲-۳- تهیه محلول APS ۱۰٪

برای تهیهی این محلول ۱۰۰ میلی گرم آمونیوم پرسولفات را در ۱ میلی لیتر آب دیونیزه حل کردیم.

### ۸-۲-۳- تهیه بافر الکتروود ۱۰ X (Running buffer)

۳۰/۳ گرم Tris base، ۱۴۴ گرم گلیسین، ۱۰ گرم SDS را در ۱۰۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل کرده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد ذخیره کردیم (PH 8.3).

### ۹-۲-۳- تهیه بافر نمونه (Sample Buffer)

این محلول حاوی ۳/۵۵ میلی لیتر آب دیونیزه، ۱/۲۵ میلی لیتر Tris-Hcl ۰/۵ مولار، ۲/۵ میلی لیتر گلیسرول، ۲ میلی لیتر SDS ۱۰٪، ۰/۲ میلی لیتر بروموفنول بلو ۰/۵٪ و ۵۰ میکرولیتر بتا-مرکاپتواتانول است که حجم نهایی محلول به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد و در دمای اتاق نگهداری گردید.

### ۱۰-۲-۳- تهیه محلول Tris- Hcl ۰/۵ مولار

۶ گرم Tris base به ۶۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه گردید و با افزودن مقدار مناسبی از Hcl به محلول PH روی ۶/۸ تنظیم گردید و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

### ۱۱-۲-۳- تهیه محلول Tris- Hcl ۱/۵ مولار

۲۷/۲۳ گرم Tris base به ۸۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه گردید و با افزودن مقدار مناسبی از Hcl به محلول PH روی ۸/۸ تنظیم گردید و حجم نهایی به ۱۵۰ میلی لیتر رسانده شد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

### ۳-۲-۱۲- تهیه Staining Buffer

برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر از این بافر به میزان ۵۰ میلی لیتر متانول با ۰/۰۵ گرم کماسی بلو، ۱۰ میلی لیتر استیک اسید و ۴۰ میلی لیتر آب مقطر استفاده گردید.

### ۳-۲-۱۳- تهیه Destaining Buffer

برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر از این بافر به میزان ۵ میلی لیتر متانول با ۷ میلی لیتر استیک اسید و ۸۸ میلی لیتر آب مقطر استفاده گردید.

### ۳-۲-۱۴- تهیه محلول آکريل آمید- بیس آکريل آمید

۸۷/۶ گرم آکريل آمید با ۲/۴ گرم بیس آکريل آمید را در ۳۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل کرده و پس از فیلتر کردن در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

### ۳-۲-۱۵- تهیه بافر SDS

برای تهیه ۱۰ میلی لیتر از این بافر، ۱۰ گرم SDS را در ۵ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس به حجم ۱۰ میلی لیتر رساندیم این محلول در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

### ۳-۲-۱۶- تهیه بافر A (Washing Buffer)

۵/۹۵ گرم HEPES، ۵/۸۴ گرم NaCl و ۱/۳۶ گرم Imidazole را در ۱ لیتر آب مقطر حل کرده تا غلظت نهایی به ترتیب ۲۵، ۱۰۰ و ۱۰ میلی مولار باشد سپس محلول را در دمای ۴ درجه سانتیگراد ذخیره کردیم (PH7.5).

### ۳-۲-۱۷- تهیه بافر B (Eluting Buffer)

۵/۹۵ گرم HEPES، ۵/۸۴ گرم NaCl و ۶۸ گرم Imidazole را در ۱ لیتر آب مقطر حل کرده تا غلظت نهایی به ترتیب ۲۵، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی مولار باشد سپس محلول را در دمای ۴ درجه سانتیگراد ذخیره کردیم (PH 7.5).

### ۳-۲-۱۸- تهیه بافر دیالیز

۱۵/۶۸ گرم Tris-Hcl و ۲۳/۳۶ گرم NaCl را در ۴ لیتر آب مقطر حل کرده تا غلظت نهایی به ترتیب ۲۵ و ۱۰۰ میلی مولار باشد سپس محلول را در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری نمودیم (PH 7.5).

### ۳-۲-۱۹- تهیه استوک گوانیدین هیدروکلراید (GdnHCl)

۴۸/۲۵ گرم گوانیدین هیدروکلراید را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کردیم تا غلظت نهایی به ۸ مولار برسد.

### ۳-۳- تهیه نارنجین

نارنجین را در DMSO حل کرده و یک غلظت نهایی ۲ میلی مولار از گالیک اسید تهیه کردیم سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری کردیم.

### ۳-۳-۱- آماده سازی محیط‌های کشت باکتری

محیط کشت LB Broth را در حجم یک لیتر با اضافه کردن ۲۰ گرم پودر LB تهیه کردیم سپس اتوکلاو کرده و پس از خنک شدن با اضافه کردن مقدار مناسبی از آنتی بیوتیک مورد استفاده قرار دادیم.

### ۳-۳-۲- محیط کشت LB Broth

محیط کشت LB Broth را در حجم یک لیتر با اضافه کردن ۲۰ گرم پودر LB تهیه کردیم سپس اتوکلاو کرده و پس از خنک شدن با اضافه کردن مقدار مناسبی از آنتی بیوتیک مورد استفاده قرار دادیم.

### ۳-۳-۳ محیط کشت LB Agar

محیط کشت LB Agar را در حجم ۲۵۰ میلی لیتر با اضافه کردن ۵ گرم LB و ۳/۷۵ گرم آگار تهیه کردیم سپس اتوکلاو نموده و پس از خنک شدن با اضافه نمودن مقدار مناسبی از آنتی بیوتیک محیط را داخل پلیت ریخته و از آن جهت محیط کشت جامد باکتری استفاده کردیم.

### ۳-۴-۳ روش انجام کار

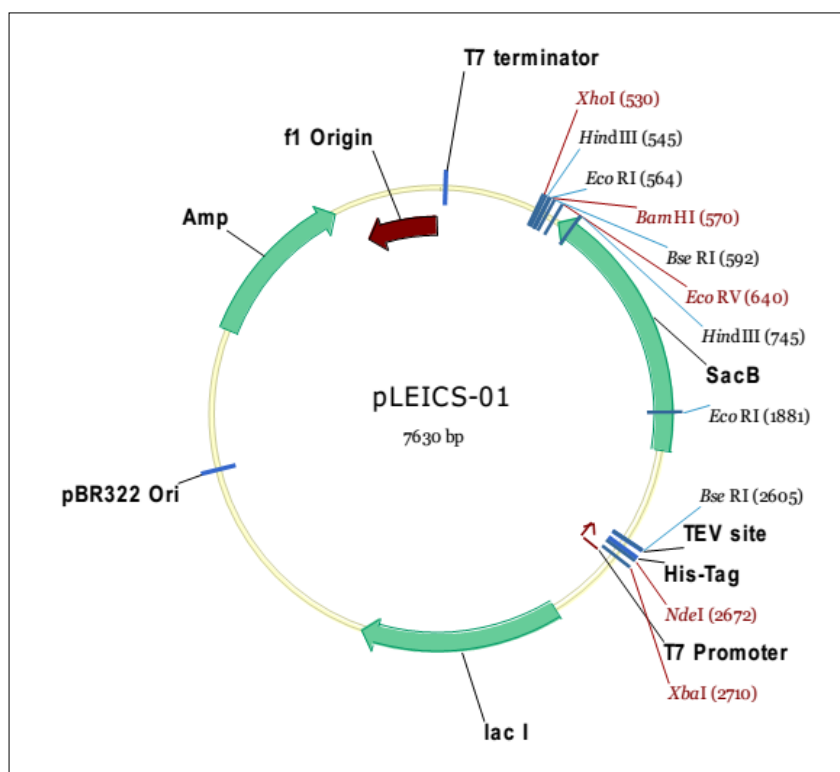
Query	14	PMLAGVSEFELPEDPKWEFPRDKLTLGKPLGEGAFQVVM AEAVGIDKDKPKEAVTVAVK	73
Sbjct	458	PMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKLTLGKPLGEGCFQVVM AEAVGIDKDKPKEAVTVAVK	517
Query	74	MLKDDATEKDLSDLVSEMEMMKMIGKHNIINLLGACTQDGPLYVIVAYASKGNLREYLR	133
Sbjct	518	MLKDDATEKDLSDLVSEMEMMKMIGKHNIINLLGACTQDGPLYVIVAYASKGNLREYLR	577
Query	134	ARRPPGMELSLDINRVPEEQMTFKDLVSCTYQLARGMEYLASQKCIHRDLAARNVLVTEN	193
Sbjct	578	ARRPPGMEYSYDINRVPEEQMTFKDLVSCTYQLARGMEYLASQKCIHRDLAARNVLVTEN	637
Query	194	NVMKIADFGLARDINNIDFFKETTNGRLPVKWM APEALFDRVYTHQSDVWSFGVLMWEIF	253
Sbjct	638	NVMKIADFGLARDINNIDYYKETTNGRLPVKWM APEALFDRVYTHQSDVWSFGVLMWEIF	697
Query	254	TLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDKPANCTNELYMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDL	313
Sbjct	698	TLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDKPANCTNELYMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDL	757
Query	314	DRILTLTTNEEYLDLSQPLEQ	334
Sbjct	758	DRILTLTTNEEYLDLSQPLEQ	778

A

شکل ۳-۱- نمایش ساختار پلاسمید نوترکیب pLEICS-01 و توالی ژنی ناحیه تیروزین کینازی

پروتئین نوترکیب FGFR2b





شکل ۳-۲ - توالی ژنی ناحیه کینازی و نقشه شماتیک از پلاسمید pLEICS-01

تصویر A نشان دهنده توالی ژنی ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b و تصویر B نشان دهنده نقشه شماتیک از پلاسمید pLEICS-01 است. این پلاسمید به پروتئین در ناحیه N-terminal دنباله هیستیدینی اضافه می کند (His6-tag). وکتور دارای ناحیه برش آنزیمی TEV پروتئاز جهت برداشتن دنباله هیستیدینی از پروتئین است. هم چنین وکتور شامل آغاز کننده T7 و خاتمه دهنده T7 است.

### ۳-۵ - مراحل تولید پروتئین نوترکیب

۳-۵-۱ - تهیه سلول های پذیرا (competent cells)

بدین منظور ابتدا محلول های زیر را آماده کردیم:

۱۰ میلی لیتر محیط کشت استریل LB بدون آنتی بیوتیک تهیه کردیم. هم چنین محیط کشت SOB

حاوی ۲ گرم تریپتون، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۰۵ گرم NaCl را در ۹۵ میلی لیتر آب دیونیزه حل

کرده و نیز ۱ میلی لیتر KCl میلی مولار اضافه نمودیم و PH محلول را برابر با ۷ تنظیم کردیم. و حجم نهایی را با آب دیونیزه به ۱۰۰ رساندیم. در دو فلاسک ۲۵۰ میلی لیتری تقسیم و اتوکلاو نمودیم. قبل از استفاده به محلول ۰/۵ میلی لیتر  $MgCl_2$  استریل با غلظت ۲ مولار اضافه کردیم. محلول گلیسرول ۵۰ درصد را پس از آماده کردن جهت استریل سازی اتوکلاو نموده و در دمای ۴ درجه نگهداری کردیم. هم چنین غلظت نهایی گلیسرول در محلول را به میزان ۱۵ درصد رسانده شد. محلول  $CaCl_2$  با غلظت ۵۰ میلی مولار را با از طریق یک فیلتر ۰/۲ میکرومتری استریل نموده و درون یک محفظه استریل نگهداری کردیم.

### ۳-۵-۲- روش آماده سازی سلول های پذیرا

روی محیط کشت LB Agar بدون آنتی بیوتیک تهیه شده از قبل سلول های اشرشیا کلی BL21 DE3 را استریک کرده و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک شب انکوبه شد. یک کلونی را از روی پلیت به داخل ۱۰ میلی لیتر محیط کشت استریل وارد کرده و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه روی انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور بر دقیقه انکوبه کردیم. یک میلی لیتر از این محیط را به ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت SOB اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه روی انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور بر دقیقه انکوبه شد تا زمانی که جذب در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ رسید. سپس سلول ها توسط سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در چهار درجه سانتی گراد با ۵۰۰۰ دور بر دقیقه رسوب داده شد. رسوب سلولی خیلی آرام در ۵۰ میکرو لیتر  $CaCl_2$  سرده شده احیا گردید و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سلول ها مثل قبل رسوب داده شدند و با ۲ میلی لیتر  $CaCl_2$  در حضور سرما به آرامی احیا شدند و سلول ها روی یخ نگهداشته شدند. گلیسرول ۵۰ درصد به سلول ها اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید. به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر داخل میکروتیوپ تقسیم شد و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید.

### ۳-۵-۳- ترانسفورماسیون سلول‌های پذیرا

#### محلول‌های مورد نیاز

محلول‌های مورد نیاز برای ترانسفورماسیون شامل آماده‌سازی محیط کشت LB broth بدون آنتی بیوتیک و پلیت‌های LB agar حاوی مقدار مناسبی از آنتی بیوتیک می باشد.

#### روش ترانسفورماسیون

داخل اپندورف تیوپ‌های ۱/۵ میلی لیتری استریل به میزان ۵۰ میکرولیتر از سلول‌های پذیرا ریخته شد پس از اضافه نمودن ۴ میکرو لیتر پلاسمید تخلیص شده (پلاسمیدها به روش مینی پرپ استخراج شده بودند) به آرامی مخلوط گردید و سپس به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. از دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه به منظور ایجاد شوک حرارتی استفاده گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. به میزان ۳۰۰ میکرولیتر LB broth بدون آنتی بیوتیک به مخلوط اضافه نموده و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و داخل انکوباتور شیکر دار انکوباسیون را انجام دادیم. سلول‌ها را داخل پلیت‌های LB agar حاوی مقدار مناسبی از آنتی بیوتیک به مقدار ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر به صورت زیر تقسیم شدند. پلیت A شامل سلول‌های پذیرای حاوی پلاسمید و آنتی بیوتیک مناسب. پلیت B شامل سلول‌های پذیرا و آنتی بیوتیک. پلیت C شامل سلول‌های پذیرا و آگار فاقد آنتی بیوتیک. سرانجام در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انکوباسیون صورت گرفت. اگر کار درست انجام شده باشد باید روی پلیت‌های A و C کلنی باکتری رشد کرده باشد ولی روی پلیت B کلنی باکتری مشاهده نگردد. کلنی‌های باکتریایی که روی پلیت A رشد می کنند حاوی کلنی‌های حاوی پلاسمید مورد نظر هستند.

### ۳-۵-۴- بررسی بیان پروتئین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد

از کلنی‌های ترانسفورم شده یک کلنی مناسب انتخاب می شود و داخل ۳ میلی لیتر از محیط کشت LB که حاوی ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر آمپی سیلین بود انکوبه گردید و تقریباً به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و داخل انکوباتور شیکر دار با دور ۲۰۰ rpm رشد داده شد. سپس به

منظور ساب کالچر به میزان ۰/۵ میلی لیتر از کالچرهای رشد داده شده به داخل ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت تازه LB که حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی سیلین بود منتقل گردید و به مدت یک شب در همان شرایط داخل انکوباتور شیکر دار قرار گرفت. بعد از این مرحله سلول ها به مدت ۱۰ دقیقه درون سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ rpm گذاشته شدند. سپس رسوب های سلولی حاصل با ۱ میلی لیتر از LB تازه بدون آنتی بیوتیک احیا گردیدند و پس از آن به ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت تازه LB که حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی سیلین بود جهت ساب کالچر انتقال داده شدند. این مرحله تا زمانی که جذب در ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۱ برسد ادامه یافت. از باقیمانده ی رسوب سلولی نیز جهت استخراج پلاسمید در فریزر نگهداری شد. در ادامه به منظور رشد بیشتر کالچرها در دمای ۳۷ درجه داخل انکوباتور شیکر دار قرار داده شدند تا زمانی که جذب در ۶۰۰ نانومتر برابر ۰/۶ تا ۰/۷ شد. به این مرحله فاز رشد لگاریتمی می گویند. سپس از هر کالچر به میزان ۵۰۰ میکرولیتر داخل میکروتیوب استریل ریخته شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به منظور نمونه قبل از القا جهت آنالیز SDS- PAGE ذخیره شد. هم چنین به میزان ۷۰۰ میکرولیتر از کالچر قبل از القا با ۳۰۰ میکرولیتر از گلیسرول ۵۰ درصد مخلوط گردید و استوک حاصل با ۱۵ درصد گلیسرول در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. سپس القای بیان پروتئین ها با اضافه نمودن IPTG به میزان ۱ میلی مولار صورت گرفت. پس از هر ساعت که از زمان القای بیان پروتئین گذشت به منظور جمع آوری نمونه بعد از القا جهت آنالیز SDS-PAGE براساس حجم نمونه ی جمع آوری شده در مرحله قبل از القای بیان پروتئین نرمالایز صورت گرفت. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ rpm قرار گرفتند و سرانجام رسوب سلولی حاصل جهت آنالیز SDS-PAGE برای بررسی پروتئین تولید شده مورد استفاده قرار گرفتند.

### ۳-۵-۵- ارزیابی حلالیت پروتئین بیان شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

جهت ارزیابی حلالیت پروتئین بیان شده پس از القا در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه کالچرها را در سانتریفیوژ با دور rpm ۵۰۰۰ قرار داده شد و رسوب سلولی حاصل با اضافه نمودن ۱۰ میلی لیتر بافر لیز سلولی احیا گردید و سپس سلول ها به مدت ۲ دقیقه با استفاده از سونیکاتور که روی شرایط ۲۰ ثانیه روشن و ۲۰ ثانیه خاموش و بالاترین ولتاژ تنظیم شده بود سونیکیت گردیده و لیز شدند. به منظور آنالیز SDS-PAGE از لایزت سلولی حاصل به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به عنوان لایزت کل سلولی جمع آوری شد و هم چنین به مدت ۲۰ دقیقه باقیمانده ی لایزت را در سانتریفیوژ با دور rpm ۱۲۵۰۰ قرار داده شد. به منظور آنالیز SDS-PAGE از لایزت شفاف (soluble fractions) به میزان ۲۰ میکرولیتر جمع آوری و نگهداری شد.

### ۳-۶- روش انجام SDS-PAGE به منظور بررسی بیان پروتئین

هر نمونه با ۴۰ میکرولیتر آب دیونیزه و ۶۰ میکرولیتر از بافر نمونه مخلوط شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد حرارت داده شدند. و هم چنین به مدت ۱۵ دقیقه با حداکثر دور سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ به میزان ۲۰ میکرولیتر از سوپرناتانت هر نمونه درون چاهک های ژل با گرادیان غلظتی ۴ تا ۱۲ درصد از پلی آکریل آمید ریخته شد و هم چنین مارکر وزن مولکولی نیز درون یک چاهک قرار گرفت. جهت الکتروفورز ولتاژی برابر با ولت ۲۰۰ به مدت ۳۵ دقیقه درون میزان مناسبی از بافر الکتروود برقرار شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با بافر رنگ آمیزی به مدت ۳۵ دقیقه رنگ می شود و در آخر با بافر رنگ بر به مدت ۳۰ دقیقه رنگ زدایی صورت می گیرد.

### ۳-۶-۱- ارزیابی حلالیت پروتئین بیان شده در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد

در آنالیز SDS-PAGE جهت ارزیابی حلالیت پروتئین بیان شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نمونه ی لایزت کل سلولی با سوپرناتانت لایزت شفاف مقایسه گردید. از آنجا که در این دما پروتئین محلول نبود با تغییر شرایط آزمایش به صورت کاهش دمای رشد باکتری از ۳۷ درجه به ۲۰ درجه

سانتیگراد القای تولید پروتئین صورت گرفت. در این روش پس از کشت اولیه و رسیدن به زمانیکه جذب در ۶۰۰ نانومتر برابر با ۰/۶ تا ۰/۷ بود کالچرها به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد درون شیکر انکوباتور یخچال دار قرار داده شدند هم چنین به منظور آنالیز SDS-PAGE به میزان ۱۰۰ میکرولیتر نمونه تحت عنوان قبل از القا جمع آوری گردید. سپس به میزان ۱ میلی مولار IPTG جهت القا به محیط کشت افزوده شد و به مدت یک شب در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد در انکوباتور یخچال دار قرار داده شد. پس از تایید محلول شدن در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد پروتئین به میزان ۱ لیتر تولید گردید و در نهایت رسوب سلولی حاصل جهت تخلیص پروتئین جمع آوری گردید.

### ۳-۶-۲- تخلیص پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی

رسوب سلولی حاصل در ۳۰ میلی لیتر بافر لیز کننده احیا گردید و سونیکیت شد. سپس به مدت ۱ ساعت داخل سانتریفیوژ با دور ۱۳۵۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ سوپرناتانت شفاف جمع آوری شد و جهت خالص سازی پروتئین در ستون حاوی ۵ میلی لیتر از  $Ni^{2+}$ -NTA ریخته شد. سپس ستون با یک گرادیان غلظتی افزایشی از ایمیدازول ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار شسته شد. پروتئین سرانجام در غلظت ۷۵ میلی مولار از ستون خارج گردید. میزان خلوص پروتئین مدنظر توسط آنالیز SDS-PAGE ارزیابی گردید. فرکشن های حاوی پروتئین هدف باهم ترکیب شده و به مدت ۶ ساعت در ۴ لیتر از بافر دیالیز قرار گرفت. نمونه دیالیز شده با آنالیز SDS-PAGE بررسی گردید.

### ۳-۶-۳- تعیین غلظت پروتئین

با استفاده از دستگاه نانو دراپ غلظت پروتئین اندازه گیری شد. قبل از اندازه گیری سیستم با استفاده از یک محلول بلانک (۲ میکرولیتر از بافر حاوی ۲۵ میلی مولار Tris-HCl و ۱۰۰ میلی مولار NaCl با PH برابر ۷/۵) صفر شد. در این محاسبه وزن مولکولی پروتئین به میزان ۳۸ کیلودالتون اعمال شد.

### ۳-۷- مطالعات اسپکتروسکوپی فلوئورسنس

برای بررسی ساختار سوم پروتئین تخلیص شده در شرایط متفاوت از روش فلوئورسنس ذاتی استفاده شد. اندازه گیری شدت فلوئورسنس ذاتی با دستگاه اسپکتروفلوریمتر واریان کری اکلپس مدل Bio 700، حاوی کووت کوارتز با طول مسیر ۱۰ میلی متر صورت گرفت. آشکارساز (PMT) روی ولتاژ متوسط تنظیم شد. هر یک از دو شکاف های تحریکی و انتشاری با یک باندپاس ۵ نانومتر استفاده شد. طول موج تحریک پروتئین ۲۸۰ نانومتر بود و داده ها در دمای اتاق و طول موج نشری ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر جمع آوری شدند. به منظور از بین بردن اثر پس زمینه ی بافر حاوی پروتئین روی شدت فلوئورسنس، سیستم با استفاده از یک محلول بلانک (۴۰۰ میکرولیتر از بافر) صفر شد. پروتئین با غلظت ۰/۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر در بافر حاوی ۲۵ میلی مولار Tris-Hcl و ۱۰۰ میلی مولار NaCl با PH برابر ۷/۵ تهیه شد. غلظت پروتئین در همه ی محلول های مورد آزمایش ثابت نگه داشته شد. به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه پروتئینی داخل کووت ۴۰۰ میکرولیتری ریخته و با بافر به حجم نهایی رساندیم. به منظور بررسی اثر نارینجین روی شدت فلوئورسنس پروتئین، چندین محلول حاوی غلظت های ثابت از پروتئین در حضور غلظت های متفاوت از محدوده ی ۵۰ میکرومولار تا ۳ میلی مولار از نارینجین به طور جداگانه تهیه شد و اثر هر کدام در شرایط نرمال بررسی گردید. هم چنین با اضافه کردن میزان مناسبی از بافر به هر نمونه حجم نهایی محلول به میزان ۴۰۰ میکرولیتر نگه داشته شد. سپس طیف نشری بعد از گذشت زمان اینکوبیشن به مدت ۲۰ دقیقه گرفته شد. آزمایشات اولیه در جهت تعیین حداقل و حداکثر غلظتی از نارینجین که روی طیف نشری فلوئورسنس اثر می گذاشت صورت گرفت. طیف نشری حاصل از پروتئین در حضور و عدم حضور نارینجین با هم مقایسه شد. هر آزمایش دو بار برای هر طیف نشری تکرار شد.

### ۳-۷-۱- مطالعات دنا تورا سیون شیمیایی با استفاده از اسپکتروسکوپی فلوئورسنس

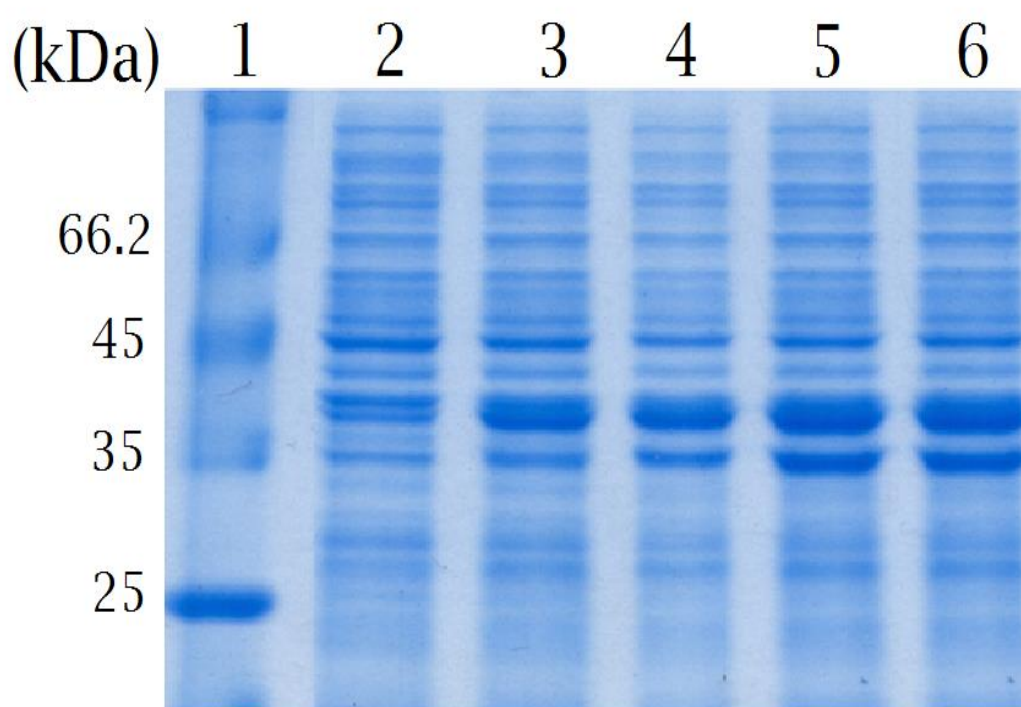
به منظور ارزیابی پایداری کنفورماسیونی پروتئین تخلیص شده غلظت های متفاوت از گوانیدین هیدروکلراید از ۰ تا ۶ مولار تهیه شد. طول موج تحریکی روی ۲۸۰ نانومتر تنظیم شد. آشکارساز (PMT) روی ولتاژ بالا تنظیم شد. در حضور حداکثر غلظت موثر مشاهده شده در طیف نشری فلوئورسنس یعنی ۳ میلی مولار از **نارینجین** دنا تورا سیون شیمیایی انجام گرفت. چندین محلول حاوی پروتئین با غلظت ثابت به میزان ۰/۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر در بافر حاوی ۲۵ میلی مولار Tris-HCl و ۱۰۰ میلی مولار NaCl با PH برابر ۷/۵ تهیه شد. غلظت نهایی گوانیدین هیدروکلراید در هر محلول به میزان ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵ و ۶ مولار بود. طیف نشری پس از حدود ۶۰ دقیقه زمان انکوباسیون در حضور ۵۰ میکرو مولار از نارینجین به طور جداگانه مونیتور شد. در نهایت طول موج ماکزیمم هر نشر برای رسم نمودار در غلظت های متفاوت دنا توره کننده استفاده گردید. هر آزمایش دو بار تکرار شد.



## فصل چهارم: یافته ها و نتایج

#### ۴-۱- بررسی بیان پروتئین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد

برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب، باکتری‌های تراریخته در محیط مناسب کشت داده شدند و نمونه‌ها قبل و بعد از القا توسط IPTG مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج SDS-PAGE نشان داد که بعد از القا توسط IPTG، پروتئین نوترکیب مورد نظر با اندازه تقریبی ۳۸ کیلودالتون بیان شده است. نتایج نشان داد که بهترین میزان بیان ۳ الی ۴ ساعت بعد از القا توسط IPTG می‌باشد (شکل (۴-۱)).

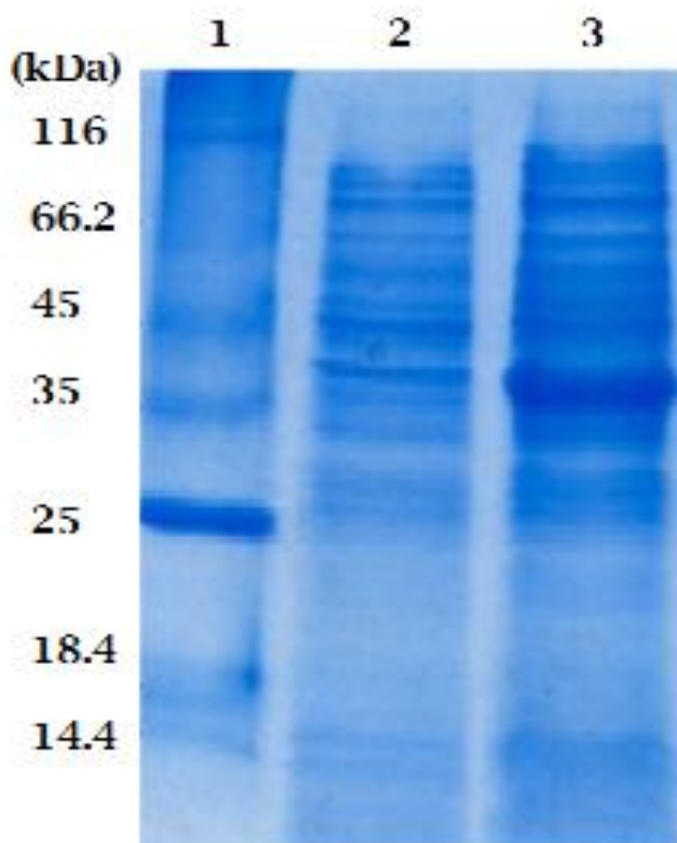


شکل ۴-۱- بیان ژن ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب *FGFR2b* در باکتری *E. coli* در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد.

ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی، ستون ۲ نمونه لیز شده باکتری دارای حامل نوترکیب قبل از القاء با IPTG با غلظت یک میلی‌مولار و ستون‌های ۳ الی ۶ بعد از القاء با IPTG به ترتیب در فاصله زمانی یک، دو، سه و چهار ساعت بعد از القاء می‌باشد.

#### ۲-۴- بررسی بیان پروتئین در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد

نتایج SDS-PAGE نشان داد که در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، بعد از القا توسط IPTG، پروتئین نوترکیب مورد نظر با اندازه تقریبی ۳۸ کیلودالتون بیان شده است (شکل ۲-۴).



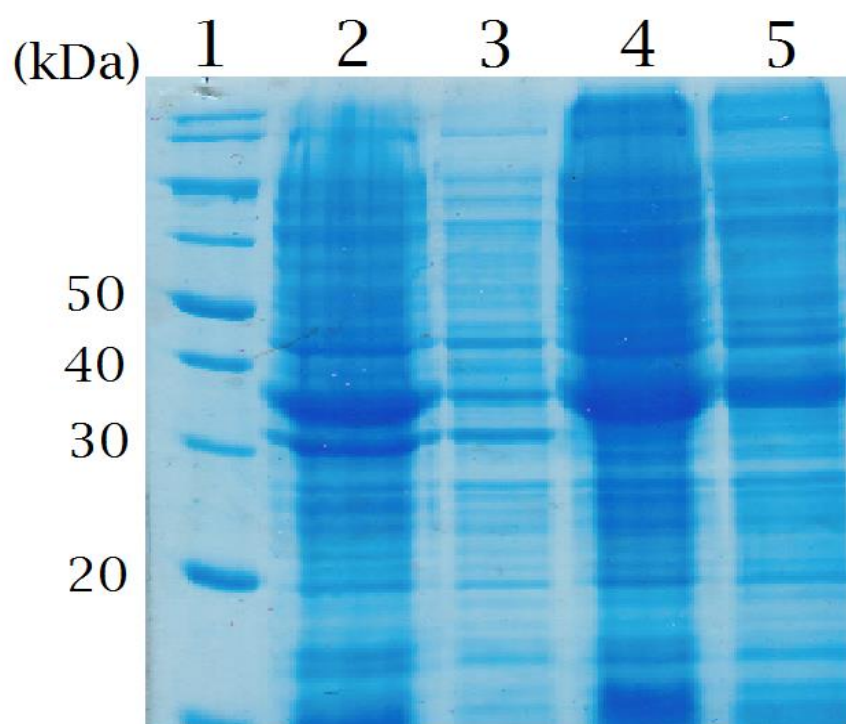
شکل ۲-۴- بیان ژن ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب *FGFR2b* در باکتری *E. coli* در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد.

ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی، ستون ۲ نمونه لیز شده باکتری دارای حامل نوترکیب قبل از القاء با IPTG با غلظت یک میلی‌مولار و ستون ۳ بعد از القاء با IPTG بعد از یک فاصله بیست و چهار ساعت بعد از القاء می‌باشد.

#### ۳-۴- بررسی حلالیت پروتئین بیان شده در دو دمای ۲۰ و ۳۷ درجه

##### سانتی گراد

بعد از بیان پروتئین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و مقایسه‌ی نمونه‌های حاصل از لیز سلول و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ آن توسط SDS-PAGE مشاهده شد که پروتئین بیان شده نامحلول است. با تکرار آزمایش در چند دمای مختلف کمتر از ۳۷ درجه سانتیگراد و القای تولید پروتئین در شرایط کاهش دمایی، در نهایت در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد پروتئین مورد نظر در فاز محلول به دست آمد (شکل ۱۵).

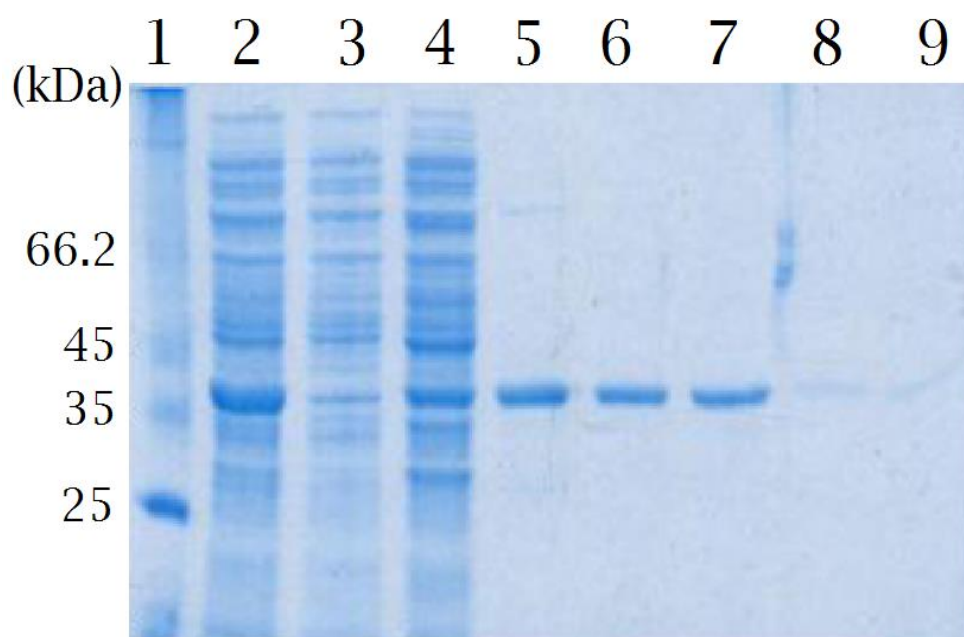


شکل ۳-۴ - مقایسه‌ی حلالیت ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نو ترکیب *FGFR2b* در دو دمای ۲۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد.

ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی، ستون ۲ و ۳ به ترتیب نمونه لیز شده باکتری و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ستون ۴ و ۵ به ترتیب نمونه لیز شده باکتری و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد.

#### ۴-۴- بررسی میزان خلوص پروتئین محلول شده

با توجه به وجود دنباله پلی‌هیستیدین در ابتدای پروتئین مورد نظر برای خالص‌سازی پروتئین بیان شده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA استفاده شد. شستشوی ستون با استفاده از شیب غلظت ایمیدازول از ۵۰ الی ۲۰۰ میلی‌مولار صورت پذیرفت. میزان خلوص پروتئین مورد نظر توسط SDS-PAGE ارزیابی گردید. چنان که در الگوی الکتروفورز مشاهده می‌شود پروتئین مورد نظر با درجه خلوص مناسبی خالص گردید (شکل ۴-۴).

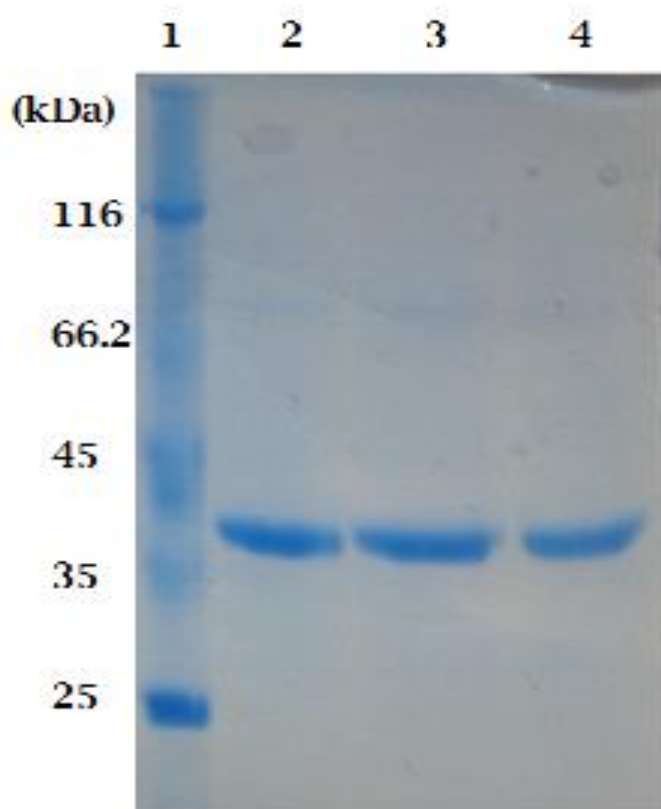


شکل ۴-۴- خالص‌سازی ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب *FGFR2b* با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA

ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی، ستون ۲ نمونه اولیه قبل از خالص سازی، ستون ۳ نمونه بعد از شستشوی اولیه ستون کروماتوگرافی و ستون ۵ الی ۹ نمونه های بعد از شستشوی ستون کروماتوگرافی با ایمیدازول با شیب غلظت ۵۰ تا ۲۰۰ میلی مولار.

#### ۴-۵- آنالیز SDS-PAGE بعد از دیالیز

جهت خارج نمودن ایمیدازول از محلول حاوی پروتئین، بعد از تخلیص پروتئین مورد نظر دیالیز شد و جهت اطمینان از وجود پروتئین و کمیت آن بعد از دیالیز SDS-PAGE انجام شد (شکل ۴-۵).

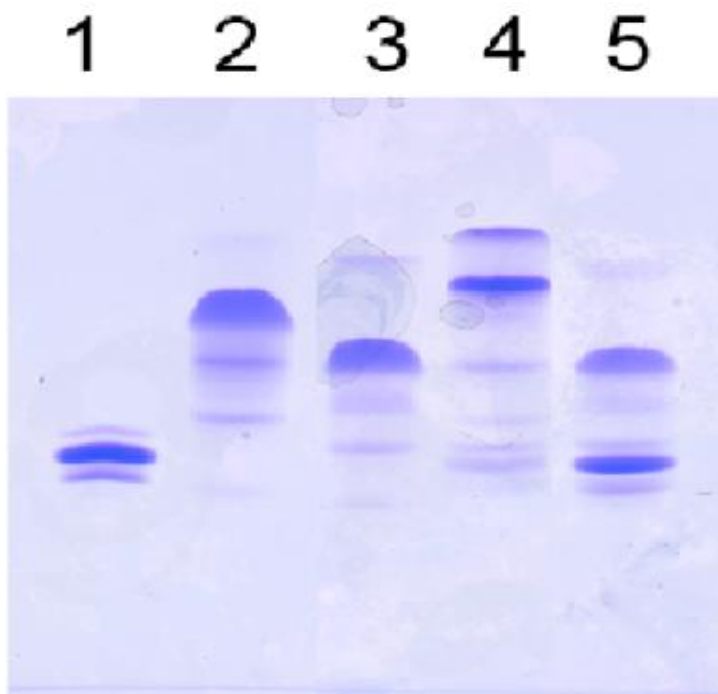


شکل ۴-۵- نتایج SDS-PAGE بعد از دیالیز.

ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی و ستون ۲ به بعد نشان دهنده نمونه دیالیز شده می باشد.

#### ۴-۶- بررسی عملکرد پروتئین خالص شده

از اتصال ناحیه کینازی پروتئین مورد نظر با ناحیه SH2 موجود در سوبسترای گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی جهت بررسی عملکرد پروتئین خالص شده استفاده شد (شکل ۴-۶). بررسی الگوی حاصل از PAGE مشخص می‌نماید که ناحیه کینازی پروتئین مورد نظر با پپتیدی که دارای ناحیه SH2 است تعامل برقرار نموده است (ستون چهارم شکل ۴-۶) و کمپلکس حاصل دارای الگوی الکتروفورزی متفاوت از هر کدام از دو جزء به تنهایی می‌باشد (ستون اول و دوم شکل ۴-۶) در حالی که الگوی الکتروفورزی مخلوط حاوی پروتئین مورد نظر با پپتیدی که دارای ناحیه جهش یافته SH2 است که توانایی اتصال به ناحیه کینازی پروتئین مورد نظر را ندارد (ستون پنجم شکل ۴-۶) با الگوی الکتروفورزی هر کدام از دو جزء به تنهایی یکسان است (ستون اول و سوم شکل ۴-۶) که نشان دهنده عدم اتصال پروتئین مورد نظر با پپتیدی که دارای ناحیه جهش یافته SH2 است می‌باشد.



شکل ۴-۶- بررسی عملکرد ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b خالص شده.

ستون ۱ ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب **FGFR2b**، ستون ۲ پپتید دارای ناحیه‌ی **SH2**، ستون ۳ پپتید دارای ناحیه‌ی **SH2** جهش یافته، ستون ۴ کمپلکس پروتئین مورد نظر با پپتید دارای ناحیه‌ی **SH2** و ستون ۵ مخلوط حاوی پروتئین مورد نظر با پپتید دارای ناحیه‌ی جهش یافته **SH2**.

#### ۴-۷- بررسی ساختار سوم ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب

FGFR2b

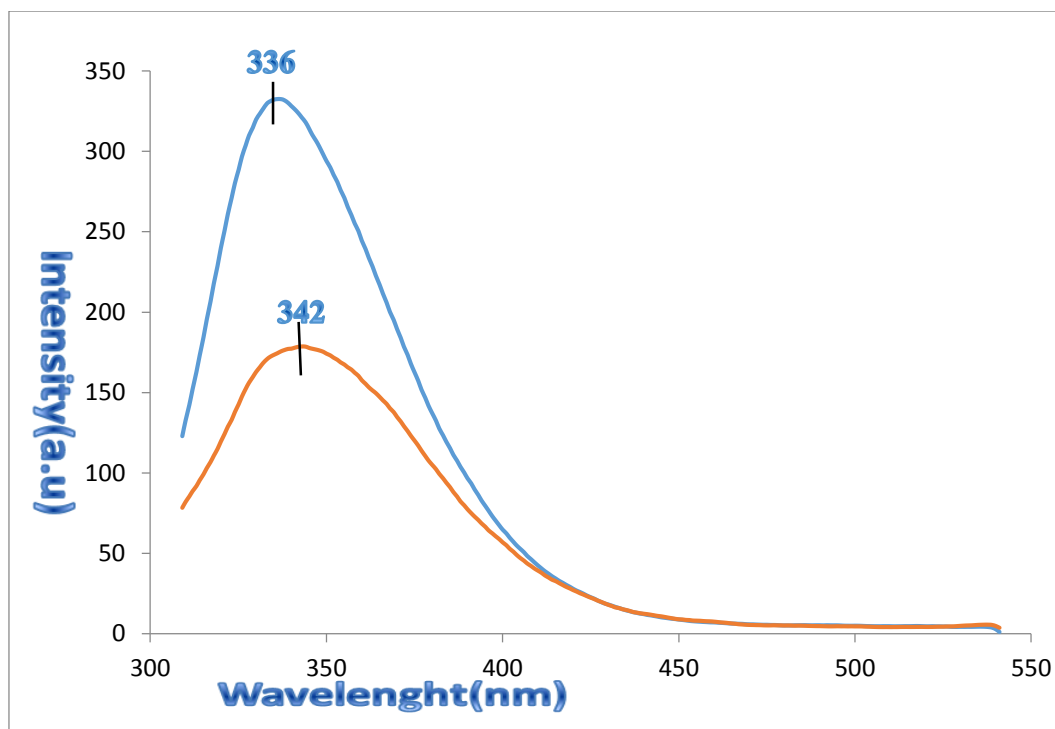
با استفاده از روش فلوئورسنس ذاتی وضعیت ساختار سوم ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در عدم حضور و هم‌چنین در حضور نارینجین در دمای اتاق بررسی شد. نتایج افزایش شدت نشر فلوئورسنس را در حضور نارینجین و با افزایش تدریجی غلظت آن‌ها نشان داد. با تیتراسیون نارینجین تغییرات کمی در شیف‌ت حداکثر طول موج نشری فلوئورسنس به سمت طول موجهای کوتاه‌تر مشاهده گردید.

#### ۴-۸- بررسی فلوئورسنس ذاتی فولدینگ ناحیه‌ی تیروزین کینازی

پروتئین نوترکیب FGFR2b

بررسی فلوئورسنس ذاتی فولدینگ ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در شرایط طبیعی و غیرطبیعی در حضور گوانیدین هیدروکلراید با غلظت ۶ مولار در شکل زیر نشان داده شده است. نتایج نشان داد طول موج ماکزیمم نشر که در شرایط طبیعی ۳۳۶ نانومتر است، در شرایط غیرطبیعی و در حضور گوانیدین هیدروکلراید به سمت ۳۴۲ نانومتر شیف‌ت پیدا می‌کند.





نمودار ۴-۱ - نمودارهای مربوط به آنالیز فلئورسنس ناحیه تیروزین کینازی پروتئین  
نوترکیب FGFR2b.

در شرایط طبیعی و غیرطبیعی (۶ مولار گوانیدین هیدروکلراید). خط آبی مربوط به حالت فولدشده و قرمز مربوط به حالت آنفولدشده می باشد.

#### ۴-۹- بررسی اثر دناتوراسیون شیمیایی بر طول موج ماکزیمم نشر

فلئورسنس ذاتی ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b

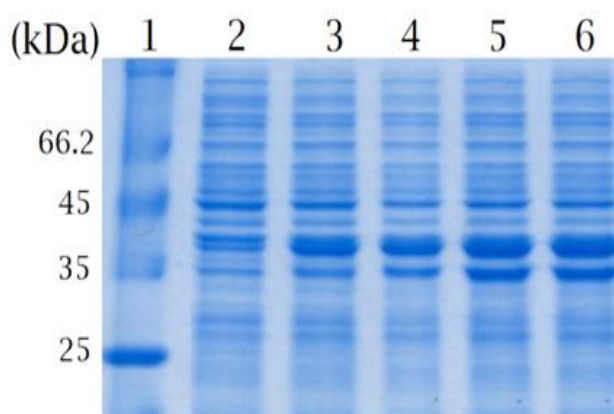
۴-۹-۱ - ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b

نتایج SDS-PAGE نشان داد که بعد از القا توسط IPTG، پروتئین نوترکیب مورد نظر با اندازه تقریبی ۳۸ کیلودالتون بیان شد و بهترین میزان بیان ۳ تا ۴ ساعت بعد از القا بود. بیان ژن ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در باکتری ایشرشیاکلی. ستون ۱: وزن مولکولی، ستون ۲: نمونه لیز شده باکتری دارای حامل نوترکیب قبل از القاء با IPTG با غلظت یک میلی مولار و

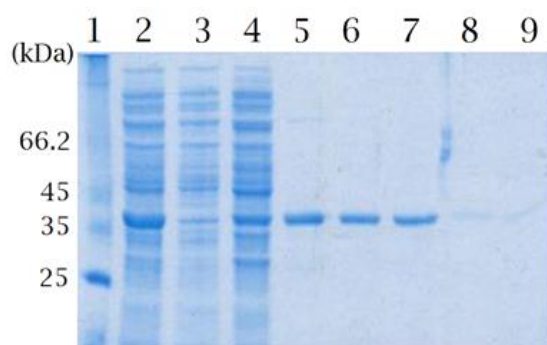
ستون‌های ۳ تا ۶: نمونه بعد از القاء با IPTG به ترتیب در فاصله زمانی یک، دو، سه و چهار ساعت بعد (شکل ۷-۴) ..

الگوی الکتروفورز (شکل ۸-۴) خالص‌سازی ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی Ni<sup>2+</sup>-NTA را نشان می‌دهد که ستون ۱: وزن مولکولی، ستون ۲: نمونه اولیه قبل از خالص‌سازی، ستون ۳: نمونه بعد از شستشوی اولیه ستون کروماتوگرافی و ستون ۴ تا ۹: نمونه‌ها بعد از شستشوی ستون کروماتوگرافی با ایمیدازول با شیب غلظت ۵۰ تا ۲۰۰ میلی مولار.

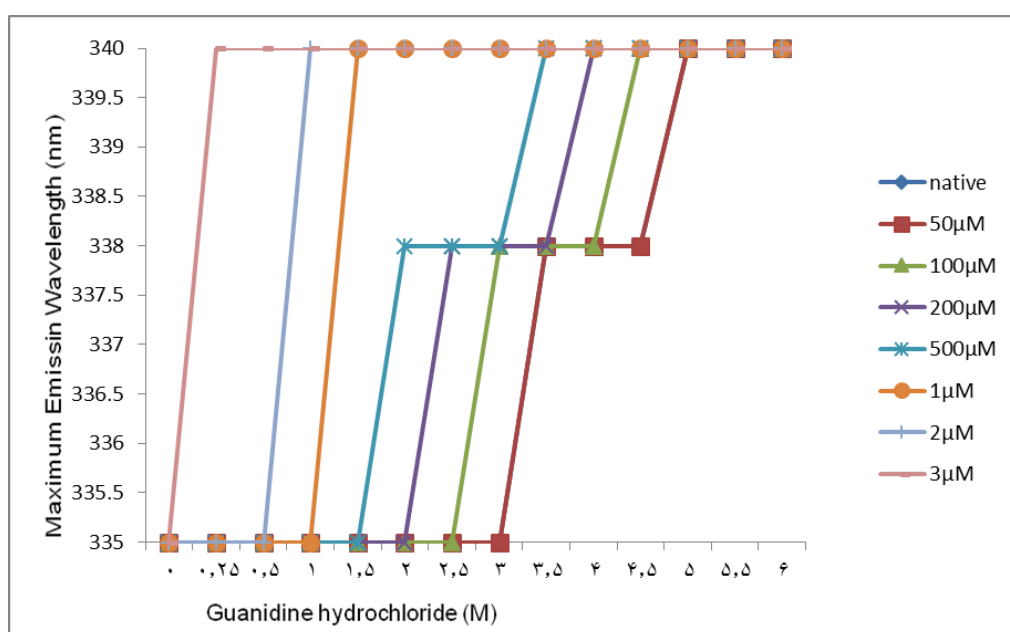
با استفاده از روش فلوئورسنس ذاتی وضعیت ساختار سوم ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در حضور نارنجین بررسی شد. نتایج افزایش شدت نشر فلوئورسنس را در حضور نارنجین و با افزایش تدریجی غلظت آن‌ها نشان داد. با تیتراسیون نارنجین تغییرات کمی در شیفت حداکثر طول موج نشری فلوئورسنس به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر مشاهده گردید (شکل ۹-۴).



شکل ۷-۴ - نمونه بعد از القاء با IPTG



شکل ۴-۸- الگوی الکتروفورز



شکل ۴-۹- وضعیت ساختار سوم ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نو ترکیب FGFR2b

## فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری

## ۵-۱- بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه ناحیه‌ی کینازی گیرنده نوترکیب فاکتور رشد فیبروبلاستی b2 در باکتری ایشرشیا کلی BL21 بیان شد و به صورت محلول و فعال خالص گردید. گیرنده‌های فاکتور رشد فیبروبلاستی با فعالیت کینازی خود نقش مهمی در تکثیر و رشد سلولی و میزان بقا و تمایز سلول‌های انسان دارند. تغییر در پیام‌رسانی سلولی به واسطه‌ی این گیرنده‌ها منجر به بسیاری از سرطان‌ها در انسان می‌شود. جهش در ناحیه‌ی کینازی این گیرنده‌ها سازوکار بسیاری از این سرطان‌ها است. این کینازها به عنوان یک هدف درمانی جالب توجه برای درمان سرطان هستند (پایتل و همکارانش، ۲۰۰۹). اگرچه ترکیبات مؤثری برای مهار پروتئین کینازها شناسایی شده‌اند اما مکانیسم مولکولی دقیق این مهارکننده‌ها در مهار فعالیت پروتئین کینازی به روشنی مشخص نیست (کانی و همکارانش، ۲۰۰۸).

از آنجا که برای انجام مطالعات ساختاری و یا بررسی برهمکنش بین پروتئین و لیگاند نیاز به تهیه پروتئین خالص شده در حد میلی‌گرم می‌باشد در این مطالعه در مرحله‌ی اول پلاسمید حاوی ژن ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b تحت سیستم بیانی باکتری ایشرشیا کلی BL21 قرار گرفت و پروتئین مورد نظر به دست آمد. آماده‌سازی اولیه پروتئین به دست آمده نشان داد که حلالیت پایین آن نیاز به بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین را دارد.

مشکلی که حین تلاش برای به دست آوردن حداکثر مقدار پروتئین می‌تواند بوجود آید نامحلول شدن پروتئین بیان شده است. اگرچه ممکن است پروتئین بیش از حد بیان شده یک باند مشخص در ژل ایجاد کند با این حال پس از اینکه پروتئین خالص شود غیرفعال است. در این حالت نامحلول شدن پروتئین بدلیل اینست که فرایند تاخوردگی به صورت نادرست رخ داده است و اجسام توده‌ای تشکیل شده‌اند. یک علت تجمع توده‌های غیرفعال پروتئینی به شکل اجسام توده‌ای (Inclusion bodies)، می‌تواند بیان بیش از حد پروتئین در سیتوپلاسم باکتری باشد که رفع این مشکل از نظر بیوتکنولوژی اهمیت به سزایی دارد.

چندین روش برای به حداقل رساندن تشکیل اجسام توده مانند و دستیابی به پروتئین محلول وجود دارد که شامل تغییر متغیرهایی نظیر درجه حرارت، میزان بیان، متابولیسم میزبان و غلظت ماده‌ی القا کننده یا تغییرات مهندسی روی پروتئین هدف مثل استفاده از اتصال دنباله مناسب و نیز بیان همزمان چاپرون‌ها با پروتئین می‌باشد. هم چنین اگر علت نامحلول بودن پروتئین بیان بیش از اندازه‌ی آن باشد با کاهش دادن سطح بیان پروتئین به این مشکل می‌توان غلبه کرد. از بین روش‌های ذکر شده مهم‌ترین کار تغییر شرایط رشد باکتری است مانند رشد دادن باکتری در درجه حرارت پایین‌تر و یا در محیط کشتی که از نظر مواد مورد نیاز باکتری غنی نباشد (سورنسن و همکارانش، ۲۰۰۵).

بنابراین زمانیکه پروتئین‌ها، در یک میزبان هترولوگ مانند ایشریشیاکلی در سطوح بالا بیان می‌شوند در اغلب موارد نامحلول<sup>۱۰</sup> اند. اضافه نمودن یک دنباله پروتئینی که به میزان بالایی محلول است مانند پروتئین اتصال یابنده مالتوز (MBP) علاوه بر کمک به محلول سازی، در خالص سازی پروتئین هم نقش دارد. استفاده از تگ های His، مثال دیگری از کاربرد دنباله پروتئینی است. این دنباله هیستیدینی را می توان به پایانه N و یا C از پروتئین مورد نظر در حین کلون کردن ژن متصل کرد (آستین و همکارانش، ۲۰۰۹).

دلیل این که چرا بعضی از پروتئین‌ها زمانی که بیش از حد بیان می‌شوند تمایل به تشکیل اجسام توده<sup>۱۱</sup> ای دارند و بعضی دیگر این تمایل را ندارند هنوز به طور کامل شناخته نشده است. اما با این حال این موضوع مشخص است که نیروهایی که به طور طبیعی به تاخوردگی پروتئین منجر می‌شوند، باعث تجمع نامناسب پروتئین‌ها نیز می‌شوند. این نیروها عمدتاً نیروهای آبگریز هستند که به دلیل تمایل اتصال قوی بین زنجیره‌های جانبی آبگریز یکسری اسیدهای آمینه خاص با یکدیگر و نه با مولکول آب بوجود می‌آیند. در شرایط طبیعی، برقراری این اتصال<sup>۱۲</sup> های آبگریز یک گام کلیدی در تاخوردگی پروتئین<sup>۱۳</sup> ها است اما زمانی که غلظت پروتئین به طور مصنوعی بالا رود زنجیره‌های جانبی در مولکول<sup>۱۴</sup> های پروتئین<sup>۱۵</sup> های مختلف ممکن است با یکدیگر ارتباط برقرار کنند که منجر به تجمع و نامحلول شدن پروتئین می‌شود (سورنسن و همکارانش، ۲۰۰۵).

از آنجا که برای انجام مطالعه های ساختاری یا بررسی برهمکنش بین پروتئین و لیگاند به پروتئین خالص شده در حد میلی گرم نیاز است، در این مطالعه از پروتئین خالص شده استفاده گردید.

از آنجا که برای انجام مطالعه های ساختاری یا بررسی برهمکنش بین پروتئین و لیگاند به پروتئین خالص شده در حد میلی گرم نیاز است، در این مطالعه از پروتئین خالص شده استفاده گردید.

همان گونه که قبلا اشاره شد گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی b2 در تنظیم فرایندهای بیولوژیکی حیاتی؛ ازجمله تکثیر سلولی نقش حیاتی دارد. در مطالعه ی حاضر با استفاده از روش های اسپکتروسکوپی؛ ازجمله مطالعات فلوئورسنس تغییرات مشاهده شده بر روی ساختار سوم ناحیه ی کینازی، در حضور و عدم حضور ترکیبات نارنجین بررسی شد. در مطالعه های مختلف به منظور بررسی اثر نارنجین روی تکثیر سلولی در محیط کشت سلولی از غلظت های متفاوتی از نارنجین استفاده شده است. غلظت پروتئین در مطالعه حاضر وابسته به تکنیک استفاده شده در این نوع مطالعه است. به منظور انجام مطالعه فلوئورسنس غلظت مورد نیاز پروتئین ۰/۲ تا ۱ میلی گرم بر میلی لیتر نیاز است که در این مطالعه از غلظت ۰/۳۴ میلی گرم بر میلی لیتر پروتئین مورد نظر استفاده شد((۴۴)

نتایج این مطالعه افزایش شدت نشر فلوئورسنس را در حضور و نیز با افزایش تدریجی غلظت نارنجین نشان داد. هرچند با تیتراسیون نارنجین تغییراتی در شیفیت منحنی حداکثر طول موج نشری فلوئورسنس به سمت طول موج های کوتاهتر مشاهده شد در مطالعه ای که توسط ژانگ و همکاران انجام شد تغییرات ساختاری پروتئین (BSA) با استفاده از روش های فلوئورسنس اسپکتروسکوپی بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که شدت نشر فلوئورسنس کاهش یافته و همچنین حداکثر طول موج نشری شیفیت پیدا کرده است که این نتایج آنفولد شدن پروتئین را نشان می دهد(۸۸). در مقایسه با نتیجه<sup>۳</sup>ی حاصل از مطالعات ما می<sup>۴</sup>توان گفت که افزایش شدت نشر فلوئورسنس ناحیه کینازی در حضور نارنجین باعث پنهان شدن اسید آمینه<sup>۵</sup>های تریپتوفان انتهایی در ساختار پروتئین می<sup>۶</sup>شود.

به منظور مطالعات بیشتر و بررسی هر چه بیشتر تغییرات مشاهده شده، دنا توراسیون شیمیایی فلوئورسنس در حضور نارنجین انجام شد. این مطالعات در حضور حداکثر غلظت موثر نارنجین و در حضور افزایش تدریجی غلظت گوانیدین هیدروکلراید انجام گرفت (۴۸). در مطالعه<sup>۱۶</sup>ی حاضر نیز گوانیدین هیدروکلراید باعث دنا توره شدن ناحیه<sup>۱۶</sup>ی کینازی شد.

نتایج حاصل از دنا توراسیون شیمیایی نشان داد که فرایند آنفولدینگ ناحیه<sup>۱۶</sup>ی کینازی در حالت طبیعی یک فرایند سه مرحله<sup>۱۶</sup>ای است. وجود دو حالت گذار در این فرایند نشان دهنده<sup>۱۶</sup>ی آنفولد شدن هر ساب دومن به طور جداگانه و در غلظت<sup>۱۶</sup>های متفاوت از گوانیدین هیدروکلراید است.

بر اساس نتایج، در حین دنا توراسیون تغییرات بوجود آمده روی ساختار سوم موجب ناپایدار شدن آن در حضور نارنجین می<sup>۱۶</sup>شود.

در مطالعه ای بر روی نارنجین آزمایش کردند و به این نتیجه رسیدند که نارنجین باعث کاهش سلول های توموری پستان می شود و همچنین در تکثیر سلول، تهاجم و بقا نقش دارد. پس نارنجین به طور قابل توجهی دوام و تکثیر، تهاجم و شکل گیری سلول های توموری را کاهش می دهد (۴۰).

در مطالعه ای گزارش شده است که نارنجین می<sup>۱۶</sup>تواند فعالیت<sup>۱۶</sup> MAPK مسیر پیام<sup>۱۶</sup>رسانی را توسط گلوکز بالا در سلول های قلبی تغییر دهد (۴۳).

در این مطالعه بر اساس نتایج بدست آمده ناحیه<sup>۱۶</sup>ی کینازی گیرنده نوترکیب فاکتور رشد فیبروبلاستی b<sub>2</sub> را می توان از آن جهت بررسی برهمکنش پروتئین و لیگاند؛ از جمله اثر مهارکننده های مختلف استفاده نمود.

علاوه بر این اثر ناپایداری فلاونوئید ها از جمله نارنجین روی ناحیه<sup>۱۶</sup>ی کینازی گیرنده نوترکیب فاکتور رشد فیبروبلاستی b<sub>2</sub> می تواند در سطح مولکولی و درون سلول موجب اختلال در مسیر پیام رسانی سلول شود و فرآیندهای بیولوژیکی سلولی را دستخوش تغییر قرار دهد.



همچنین نتایج این پژوهش با مطالعات قبلی که کاربرد برخی نارنجین را به عنوان یک درمان جانبی در سرطان پیشنهاد می کنند هم جهت است. مطالعات قبلی نشان داده اند که در درمان سرطان های که مکانیسم بوجود آورنده ی آن ها اختلال در مسیر پیام رسانی سلول به واسطه ی گیرنده های فاکتور رشد فیبروبلاستی است، استفاده هم زمان از فلاونوئیدها از جمله نارنجین در کنار مهار کننده های کینازی اثر بخش است. با این وجود مطالعات بیشتری با استفاده از روش های دیگر، برای کشف مکانیسم مولکولی دقیق تاثیرات نارنجین در سرطان نیاز است.

## References:

- 1.Allen BL, Rapraeger AC. Spatial and temporal expression of heparan sulfate in mouse development regulates FGF and FGF receptor assembly. *J Cell Biol.* 2003; 163(3): 637-48
- 2.Amaru DL,Biondo PD, Field CJ.the role of conjugated linoleic acid in breast cancer growth and Development. *The Open Nutraceuticals Journal.* 2010, 3, 30-46
- 3.Aranda S, Alvarez M, Turró S, Laguna A, de la Luna S. Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A. *Mol Cell Biol.* 2008 Oct; 28(19):5899-911.
- 4.Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Dec; 315(3):971-9
- 5.Auciello G, Cunningham DL, Tatar T, Heath JK, Rappoport JZ. Regulation of fibroblast growth factor receptor signalling and trafficking by Src and Eps8. *J Cell Sci.* 2013 Jan 15; 126(Pt 2):613-24
- 6.Batey S, Nickson AA, Clarke J. Studying the folding of multidomain proteins. *HFSP J.* 2008 Dec; 2(6): 365–377
- 7.Bae JH, Lew ED, Yuzawa S, Tome´ F, Lax I, Schlessinger J. The selectivity of receptor tyrosine kinase signaling is controlled by a secondary SH2 domain binding site. *Cell.* 2009;138(3):514-24
- 8.Bcragsagell PL. Frequent translocation t (4; 14) (p16. 3; q32. 3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet.* 1997; 16:260-4
- 9.Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8(3):235-53
- 10.Bennion BJ, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 April; 29; 100(9): 5142–47
- 11.Berezin MY, Achilefu S. Fluorescence Lifetime Measurements and biological Imaging. *Chem Rev.* 2010 May 12; 110(5): 2641–2684

- .12.Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68: 729-77
- .13.Bottcher, R. T., N. Pollet, et al. "The transmembrane protein XFLRT3 forms a complex with FGF receptors and promotes FGF signalling." *Nat Cell Biol.* 2004; 6(1): 38-44
- .14.Bryant M.R, Marta C.B, Kim F.S, Bansal R. Phosphorylation and Lipid Raft Association of Fibroblast Growth Factor Receptor-2 In Oligodendrocytes. *Glia.* 2009 July; 57(9): 935–46
- .15.Byron SA, Gartside MG, Wellens CL, Mallon MA, Keenan JB, Powell MA, et al. Inhibition of activated fibroblast growth factor receptor 2 in endometrial cancer cells induces cell death despite PTEN abrogation. *Cancer research.* 2008; 68(17):6902-7
- .16.Carrillo C, Cavia Mdel M, Alonso-Torre SR. Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action: a review. *Nutr Hosp.* 2012 Nov; 27(6):1860-5
- 17.Chen Y, Barkley MD. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry.* 1998; 37:9976–9982
- .18.Claudriana Locatelli, Fabíola Branco Filippin-Monteiro, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa"Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review"*European Journal of Medicinal Chemistry* 60 (2013) 233e239
- 19.Correa DHA, Ramos CHI. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African J Biochem Res.* 2009 May, 3 (5): 164-173.
- .20.Corsetto PA, Cremona A, Montorfano G, Jovenitti IE, Orsini F, Arosio P, et al. Chemical-physical changes in cell membrane microdomains of breast cancer cells after omega-3 PUFA incorporation. *Cell Biochem Biophys.* 2012 Sep; 64(1):45-59
- .21.Cotton LM, O'Bryan MK, Hinton BT. Cellular signaling by fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) in male reproduction. *Endocr Rev.* 2008 Apr; 29(2):193-216

- 22.Damm-Welk C, Fuchs U, Wissmann W, Borkhardt A. Targeting oncogenic fusion genes in leukemias and lymphomas by RNA interference. *Semin Cancer Biol.* 2003;13:283-92
- 23.Daskiewicz JB1, Depeint F, Viornery L, Bayet C, Comte-Sarrazin G, Comte G, Gee JM, Johnson IT, Ndjoko K, Hostettmann K, Barron D. Effects of flavonoids on cell proliferation and caspase activation in a human colonic cell line HT29: an SAR study. 2005 Apr 21;48(8):2790-804.
24. Dill KA, Shortle D. Denatured states of proteins. *Annu Rev Biochem.* 1991; 60:795-825
- 25.Dobson CM. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol.* 2004; 15:3-16
26. Dode C, Levilliers J, Dupont J-M, De Paepe A, Le De N, Soussi-Yanicostas N, et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet.* 2003; 33(4):463-5
27. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature medicine.* 1996; 2(5):561-6
28. ELLIOTT MIDDLETON, JR.,CHITHAN KANDASWAMI, AND THEOHARIS C. THEOHARIDES. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells:Implications for Inflammation, Heart Disease,and Cancer. *Pharmacol Rev*52:673–751, 2000
29. Espinosa E, Zamora P, Feliu J, González Barón M. Classification of anti cancer drugs a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treat Rev.* 2003 Dec; 29(6):515-23
30. Estes KC, Rose BT, Speck JJ, Nutter ML, Reitz RC. Effects of omega 3 fatty acids on receptor tyrosine kinase and PLC activities in EMT6 cells. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1997 Nov; 17(2):81-96
31. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16(2):139-49
32. Friedrich I, Shir A, Klein S, Levitzki A. RNA molecules as anti-cancer agents. *Seminars in cancer biology.* 2004;14:223-30

33. Gartside MG, Chen H, Ibrahimi OA, Byron SA, Curtis AV, Wellens CL, et al. Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. *Mol Can Res.* 2009; 7(1):41-54
34. Gotoh N, Manova K, Tanaka S, Murohashi M, Hadari Y, Lee A, et al. The Docking Protein FRS2 $\alpha$  Is an Essential Component of Multiple Fibroblast Growth Factor Responses during Early Mouse Development. *Mol Cell Biol.* 2005 May; 25(10): 4105–4116
35. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature.* 2007; 446(7132):153-8
36. Grose R, Dickson C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine & growth factor reviews.* 2005; 16(2):179-86
37. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar; 144(5):646-74
38. Haugsten EM, Wiedlocha A, Olsnes S, Wesche Jr. Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. *Mol Cancer Res.* 2010; 8(11):1439-52
39. Hongzhong Li, Bing Yang, Jing Huang, Tingxiu Xiang, Xuedong Yin, Jingyuan Wan, et al. Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting catenin signaling pathway. *Toxicology Letters* 220 (2013) 219–228
40. Holthauzen LM, Auton M, Sinev M, Rösger J. Protein stability in the presence of cosolutes. *Methods Enzymol.* 2011; 492: 61–125
42. Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Plotnikov AN, Yu K, Ornitz DM, Mohammadi M. Structural basis for fibroblast growth factor receptor 2 activation in Apert syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2001; 98(13):7182-7
43. Ijiri TW, Mahbub Hasan AK, Sato K. Protein-Tyrosine Kinase Signaling in the Biological Functions Associated with Sperm. *J Signal Transduct.* 2012; 2012:181560
44. Jingfu Chen, Runmin Guo, Hai Yan, Lihong Tian, Qiong You, Shanghai Li, et al. Naringin Inhibits ROS-activated MAPK Pathway in High Glucose-induced Injuries in H9c2 Cardiac Cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2014, 114, 293–304.

45. Kelly SM, Price NC. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci*. 2000 Dec;1(4):349-84
46. Kalinina J, Dutta K, Ilghari D, Beenken A, Goetz R, Eliseenkova AV, et al. The alternatively spliced acid box region plays a key role in fgf receptor autoinhibition. *Structure*. 2012; 20(1):77-88
47. fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis. *Am J Hum Biol*. 2002; 70(2):472-86
48. Katoh Y, Katoh M. FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics (Review). *Int J Mol Med*. 2009; 23(3):307-11
49. Katoh M. FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2009;13(7):1-6
50. Kilgour E, Smith PD. Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clin Cancer Res*. 2012 Apr; 18(7): 1855-62
50. Kim S.H, Jun C.D, Suk K, Choi B.J, Lim H, Park S, Lee S.H, Shin H.Y, KimZ D.K, Shin T.Y. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol Sci* .2006;91:123-131.
51. Knights V, Cook SJ. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology & therapeutics*. 2010; 125(1):105-17
52. Kouchara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, et al. A lipid-anchored grb2-binding protein that links fgf-receptor activation to the ras/mapk signaling pathway. *Cell*. 1997 May; 89(5): 693-702
53. Kovalenko D, Yang X, Chen PY, Nadeau RJ, Zubanova O, Pigeon K, et al. A role for extracellular and transmembrane domains of Sef in Sef-mediated inhibition of FGF signaling. *Cell Signal*. 2006 Nov; 18(11):158-66
54. Langelier B, Linard A, Bordat C, Lavialle M, Heberden C. Long chain-polyunsaturated fatty acids modulate membrane phospholipid composition and protein localization in lipid rafts of neural stem cell cultures. *J Cell Biochem*. 2010 Aug 15; 110(6):1356-64

55. Lee D, Redfern O, Orengo C. Predicting protein function from sequence and structure. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Dec; 8(12):995-1005
56. Leitzmann MF, Stampfer MJ, Michaud DS, Augustsson K, Colditz GC, Willett WC, et al. Dietary intake of n3 and n6 fatty acids and the risk of prostate cancer. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:204-16
57. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell.* 2010; 141(7):1117-34
58. Lew ED, Furdai CM, Anderson KS, Schlessinger J. The precise sequence of FGF receptor autophosphorylation is kinetically driven and is disrupted by oncogenic mutations. *Sci Signal.* 2009; 2(58):ra6
59. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell.* 2009; 136(5):823-37
60. Manuvakhova M, Thottassery JV, Hays S, Qu Z, Rentz SS, Westbrook L, et al. Expression of the SNT-1/FRS2 phosphotyrosine binding domain inhibits activation of MAP kinase and PI3-kinase pathways and antiestrogen resistant growth induced by FGF-1 in human breast carcinoma cells. *Oncogene.* 2006 Sep; 25(44):6003-14
61. Mitsuoka T. Development of functional foods. *Biosci Microbiota Food Health.* 2014;33(3):117-28. doi: 10.12938/bmfh.33.117. Epub 2014 May 16. Review.
62. Matsunaga S, Okigaki M, Takeda M, Matsui A, Honsho S, Katsume A, et al. Endothelium-targeted overexpression of constitutively active FGF receptor induces cardioprotection in mice myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2009 May; 46(5):663-73
63. Mustafa RA, Abdul Hamid A, Mohamed S, Bakar FA. "Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants". *Journal of Food Science.* 75(1):C28-35, 2010 Jan-Feb
64. Moon H, Kim, Amy Lew Tsuhako, Erick W. Co, Dana T. Aftab, Frauke Bentzien, Jason Chen, Wei Cheng, Stefan Engst, Levina Goon, Rhett R. Klein, Donna T. Le, Morrison Mac, Jason J. Parks, Fawn Qian, Monica Rodriguez, Thomas J. Stout, Jeffrey H. Till, Kwang-Ai Won, Xiang Wu, F. Michael Yakes, Peiwen Yu, Wentao Zhang, Yeping Zhao, Peter Lamb, John M. Nuss, Wei Xu

65. Niehrs, C. and H. Meinhardt. Modular feedback. *Nature*. 2002; 417(6884): 35-6
66. Meinander NQ, Jeppsson M, Sogaard M. Optimisation of the solubility of the recombinant Itk kinase domain in *Escherichia coli*. In: Merten OW, editor. *Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells - A Comparative View on Host Physiology*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2nd edition 2001. p. 159-70
67. Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays*. 2000 Feb; 22(2):108-12
68. Orr-Urtreger A, Bedford MT, Burakova T, Arman E, Zimmer Y, Yayon A, et al. Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol*. 1993; 158(2):475-86
69. Patrick-Iwuanyanwu, K.C., Onyeike, E.N., Adhikari, A. Isolation, identification and characterization of gallic acid derivatives from leaves of *Tapinanthus bangwensis*. *Journal of Natural Products* Volume 7 (2014)
70. Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, Powell MA, Mallon MA, Davies H, et al. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene*. 2007;26(50):7158-6
71. Rajendran L, Knolker HJ, Simons K. Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Jan; 9(1):29-42
72. Rogers KR, Kikawa KD, Mouradian M, Hernandez K, McKinnon KM, Ahwah SM, et al. Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association. *Carcinogenesis*. 2010 June; 31(9) 1523–30
73. Rohmann E, Brunner HG, Kayserili H, Uyguner O, Nornberg G, Lew ED, et al. Mutations in different components of FGF signaling in LADD syndrome. *Nat Genet*. 2006; 38(4):414-7
74. Ruhe JE, Streit S, Hart S, Wong C-H, Specht K, Knyazev P, et al. Genetic alterations in the tyrosine kinase transcriptome of human cancer cell lines. *Cancer Res*. 2007; 67(23):11368-76



75. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000; 103(2):211
76. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(4):212-36
77. Street TO, Courtemanche N, Barrick D. Protein folding and stability using denaturants. *Methods* 2004
78. Suh YJ, Bae HS, Choi JY, Lee JH, Kim MJ, Kim S, et al. A novel FGFR2 mutation in tyrosine kinase II domain, L617F, in Crouzon syndrome. *J Cell Biochem*. 2014 Jan;115(1):102-10
79. Tomasovic A, Traub S, Tikkanen R. Molecular networks in FGF signaling: flotillin-1 and cbl-associated protein compete for the binding to growth factor receptor substrate 2. *PLoS One*. 2012; 7(1):29739
80. Vivian J T, Callis P R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J*. May; 80(5): 2093–2109
81. V.U. Borde1\*, P.P. Pangrikar and S.U. Tekale. Gallic Acid in Ayurvedic Herbs and Formulations. *Recent Research in Science and Technology* 2011, 3(7): 51-54
82. Wang J, Stockton DW, Ittmann M. The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(18):6169-78
83. Webster MK, Donoghue DJ. FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *TIG*. 1997; 13(5):178-82
84. KYadegarynia S, Pham A, Ng A, Nguyen D, Lialitska T, Bortolazzo A, Sivryuk V, Bremer M, White JB. “Profiling flavonoid cytotoxicity in human breast cancer cell lines: determination of structure-function relationships”. 2014 May;9(5):597-606.
85. Yewseok Suh, Farrukh Afaq, [...], and Hasan Mukhtar. A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-κB-signaling pathways. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* (2006) 9,68–76
86. Yong Lu, Feng Jiang, Hao Jiang, Kalina Wu, Xuguang Zheng, Yizhong Cai, Mark Katakowski, Michael Choppb, Shing-Shun Tony. Gallic acid suppresses cell viability,

proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells"European Journal of Pharmacology 641 (2010) 102–107

87. Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, et al. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. J Tissue Eng. 2010 Nov; 7:218142

88. Xia Zhang, Lin Li, Zhenbo Xu, Zhili Liang, Jianyu Su, Jianrong Huang, et al. Investigation of the Interaction of Naringin Palmitate with Bovine Serum Albumin: Spectroscopic Analysis and Molecular Docking. March 2013, e59106

## **Abstract:**

**Background:** FGFR2b plays a significant role in cell signaling pathway, regulating several key biological processes including cellular differentiation and proliferation. Genetic alterations of the tyrosine kinase domain of FGFR2b, point mutations for example, occur in breast cancer, ovarian cancer and prostate cancer. Several epidemiological, in vitro and animal studies have demonstrated that flavonoids, such as naringin can influence the growth and proliferation of many different human tumor types. Naringin is a biologically active compound is cytotoxic against certain cancer cells without harm to normal cells enter. Naringin significantly regulated phosphorylation of two members of the PI3K / AKT and RAS / MAPK signal transduction pathways decreases. Also on cell proliferation, invasion, and survival of the cells.

**Objective:** The present study was analysis of its tertiary structure changes upon interaction with naringin.

**Methods:** Expression of recombinant protein was induced with 1mM IPTG at 37 °C and analyzed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The protein was purified by affinity chromatography. The protein sample was dialyzed and then used to analyze using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).Chemical denaturation and intrinsic fluorescence spectra of the purified proteins were carried out by adding different concentrations of as naringin.

**Findings:** The intrinsic fluorescence emission spectra kinase domain in the presence of naringin shows an increase in fluorescence maximum emission wavelength (nm) and FGFR2b protein was unstable.

**Conclusion:** Rigarding to the results, the tertiary structural change kinase domain reflects a conformational change within the protein that is important for the biological function of FGFR2b.

**Keyword:** Fibroblast growth factor receptor, kinase domain, naringin, flouresence spectroscopy